

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Innere Medizin

I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Gastroenterologie mit Sektionen Infektiologie und Tropenmedizin

Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse

Analyse der EXP1-spezifischen CD4+ T-Zell-Antwort während der akuten *Plasmodium falciparum* Malaria-Infektion.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Janna Heide

aus Heide

Hamburg 2020

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.05.2021

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

PD Dr. Christian Krebs

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

PD Dr. Julian Schulze zur Wiesch

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Publikation | 4 |
| 2 | Darstellung der Publikation | 19 |
| 2.1 | Einleitung | 19 |
| 2.2 | Material und Methoden | 25 |
| 2.3 | Ergebnisse | 27 |
| 2.4 | Diskussion | 31 |
| 3 | Literaturverzeichnis | 35 |
| 4 | Summary of publication | 45 |
| 5 | Zusammenfassung der Publikationspromotion | 46 |
| 6 | Erklärung des Eigenanteils..... | 47 |
| 7 | Danksagung..... | 48 |
| 8 | Lebenslauf | 49 |
| 9 | Eidesstattliche Versicherung | 50 |



Detection of EXP1-Specific CD4+ T Cell Responses Directed Against a Broad Range of Epitopes Including Two Promiscuous MHC Class II Binders During Acute *Plasmodium falciparum* Malaria

Janna Heide^{1,2}, Nils H. Wildner¹, Christin Ackermann¹, Melanie Wittner^{1,2}, Matthias Marget³, Alessandro Sette^{4,5}, John Sidney⁴, Thomas Jacobs⁶ and Julian Schulze zur Wiesch^{1,2*}

¹ Infectious Diseases Unit, I. Department of Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany,

² German Center for Infection Research (DZIF), Partner Site Hamburg-Lübeck-Borstel-Riems, Hamburg, Germany,

³ Department of Transfusion Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ⁴ Division of Vaccine Discovery, La Jolla Institute for Immunology, La Jolla, CA, United States, ⁵ Division of Infectious Diseases,

Department of Medicine, University of California, San Diego, La Jolla, CA, United States, ⁶ Protozoa Immunology,

Bernhard-Nocht-Institute for Tropical Medicine, Hamburg, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Moriya Tsuji,
Aaron Diamond AIDS Research
Center, United States

Reviewed by:

Adrian John Frederick Luty,
Institut de recherche pour le
développement (IRD), France
Katsuyuki Yui,
Nagasaki University, Japan

*Correspondence:

Julian Schulze zur Wiesch
julianszw@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Vaccines and Molecular Therapeutics,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 12 September 2019

Accepted: 11 December 2019

Published: 22 January 2020

Citation:

Heide J, Wildner NH, Ackermann C,
Wittner M, Marget M, Sette A,
Sidney J, Jacobs T and Schulze zur
Wiesch J (2020) Detection of
EXP1-Specific CD4+ T Cell
Responses Directed Against a Broad
Range of Epitopes Including Two
Promiscuous MHC Class II Binders
During Acute *Plasmodium falciparum*
Malaria. *Front. Immunol.* 10:3037.
doi: 10.3389/fimmu.2019.03037

Background: T cells are thought to play a major role in conferring immunity against malaria. This study aimed to comprehensively define the breadth and specificity of the *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*)-specific CD4+ T cell response directed against the exported protein 1 (EXP1) in a cohort of patients diagnosed with acute malaria.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells of 44 patients acutely infected with *P. falciparum*, and of one patient infected with *P. vivax*, were stimulated and cultured *in vitro* with an overlapping set of 31 *P. falciparum*-specific 13-17-mer peptides covering the entire EXP1 sequence. EXP1-specific T cell responses were analyzed by ELISPOT and intracellular cytokine staining for interferon- γ production after re-stimulation with individual peptides. For further characterization of the epitopes, *in silico* and *in vitro* human leukocyte antigen (HLA) binding studies and fine mapping assays were performed.

Results: We detected one or more EXP1-specific CD4+ T cell responses (mean: 1.09, range 0–5) in 47% (21/45) of our patients. Responses were directed against 15 of the 31 EXP1 peptides. Peptides EXP1-P13 (aa60-74) and P15 (aa70-85) were detected by 18% ($n = 8$) and 27% ($n = 12$) of the 45 patients screened. The optimal length, as well as the corresponding most likely HLA-restriction, of each of these two peptides was assessed. Interestingly, we also identified one CD4+ T cell response against peptide EXP1-P15 in a patient who was infected with *P. vivax* but not *falciparum*.

Conclusions: This first detailed characterization of novel EXP1-specific T cell epitopes provides important information for future analysis with major histocompatibility complex-multimer technology as well as for immunomonitoring and vaccine design.

Keywords: malaria, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, CD4+, CD8+, T cell epitope, HLA binding, HLA class II

INTRODUCTION

Two hundred and nineteen million cases of malaria and 435,000 deaths were recorded in 2017, mostly in Africa, and half of the world's population is at risk of the disease (1). *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) is the species that causes the majority of deaths, and drug and insecticide resistance is increasing. A consistent solution would be the broad employment of a -thus far elusive- effective and durable protective malaria vaccine (2).

The exact mechanisms that lead to protection against malaria have not been fully defined, but both specific CD4+ and CD8+ T cells are thought to play a major role in conferring immunity against malaria (3–6). Obstacles in vaccine development are the large genome of *P. falciparum*, that encodes for more than 5,000 proteins (7). These malaria proteins exhibit great diversity and are partially only expressed at certain stages of the *plasmodial* life cycle, making them difficult targets for the immune system and vaccine design (8).

As a consequence, only relatively few *P. falciparum*-specific T cell epitopes located on a small number of malaria antigens have been identified and characterized in detail (9). Additionally, studies on the phenotype and function of *P. falciparum*-specific T cells are largely missing. Furthermore, detailed immunological studies that assess the T cell repertoire in correlation with patient characteristics [such as the origin and the human leukocyte antigen (HLA) alleles] and the clinical course of the disease [complicated vs. uncomplicated course, anemia, parasitaemia, or the C-reactive protein (CRP)] are lacking. Thus, fine mapping of the optimal length of T cell epitopes and investigation of their HLA-restriction will allow the synthesis of suitable major histocompatibility complex (MHC)-multimers for phenotypical analysis that are necessary to understand the function of T cells in malaria (10).

The 162 amino acid long exported protein 1 (EXP1) plays a pivotal role for the parasite at different stages of the life cycle. It is, for example, a component within the parasitophorous vacuole membrane (PVM) that separates and protects the parasite from the cytosol of the host cell (11). The sequence of EXP1 is well conserved across different strains of *Plasmodium* species (Supplementary Table 1). The expression of EXP1 during the liver and the blood stage of the *plasmodial* life cycle inside the human host potentially makes it an ideal target for *P. falciparum*-specific CD4+ and CD8+ T effector cells. CD8+ T cells are thought to play an important role during the liver stage because they are able to attack infected hepatocytes (that present peptides on MHC class I molecules) (3). CD4+ T cells are considered to mainly confer immunity during the blood stage in which erythrocytes (that do not carry MHC class I molecules) are being invaded by the parasite (12).

Former studies have shown that antibodies against EXP1 were able to inhibit parasite growth *in vitro* as well as *in vivo* (13, 14). Also, DNA vaccines containing the *P. falciparum* EXP1 molecule and synthetic peptides from the C-terminal region of EXP1 conferred protection in mice (15, 16).

EXP1 is expressed at two different life cycle stages where it is assumed to have important physiological functions (17),

and it has shown encouraging results in previous vaccine studies. This makes EXP1 a promising target antigen for vaccine development (18–20). So far, only four CD4+ and six CD8+ EXP1-specific T cell epitopes have been described (Supplementary Figure 1) (21–25).

In this study we comprehensively defined 15 different *P. falciparum*-specific EXP1 CD4+ T cell epitopes using a previously established *in vitro* culture protocol for pathogen-specific T cells (26–29), and evaluated clinical parameters as well as patients' characteristics. We also performed fine mapping and HLA binding experiments that will allow the design of suitable MHC-multimers to characterize the phenotype of the T cell response in future studies (29).

MATERIALS AND METHODS

Patient Cohort

PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) of *P. falciparum* infected patients ($n = 44$) and one patient infected with *Plasmodium vivax*, as well as uninfected healthy controls ($n = 10$) collected at University Medical Center Hamburg-Eppendorf, were either used freshly or stored in liquid nitrogen (-196°C). *P. falciparum* infection was verified microscopically by experienced lab technicians in the diagnostic department of the Bernhard-Nocht-Institute for Tropical Medicine, Hamburg, Germany. Thick and thin blood smears were stained with 4% Giemsa and examined under oil immersion (original magnification $\times 100$). Patients were further sub-stratified into two groups for some of the analysis. Group 1 ($n = 11$) included patients originally from Germany and group 2 ($n = 31$) included patients who were born in Africa. Two patients came from the Philippines and Jamaica. We also compared patients with a complicated (30) ($n = 11$) and uncomplicated ($n = 33$) course of the disease and we distinguished between patients that had the first malaria infection ($n = 17$) and patients that have had prior malaria infections ($n = 27$). Other clinical parameters including parasitaemia, CRP, hemoglobin and thrombocytes were also assessed and are shown in Table 1 (clinical details for patient HH-43 are unknown).

EXP1 Peptides

Thirty-one 13-17-mer peptides overlapping by ten amino acids corresponding to the complete amino acid sequence of the EXP1 protein [Uniprot.org; UniProt ID: Q9U590 (31)] were synthesized (peptides&elephants, Hennigsdorf, Germany), and pooled into 3 pools of 10, 10 and 11 peptides (Table 2). For *in vitro* culture peptide pools were used at a total concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$ [concentration of a single peptide within the pool was accordingly 1 $\mu\text{g/ml}$ (1/10)]. For the enzyme linked immunospot assays (ELISPOT) the concentration of single peptides was 10 $\mu\text{g/ml}$. Further peptides for truncation experiments and variants from different strains were also synthesized. Various sequences were found on uniprot.org (Supplementary Table 1) (32). We used the terms [EXP1; exported protein 1; circumsporozoite-related protein 1; circumsporozoite-related antigen 1] for the protein name and *P. falciparum* [PLAFA] or *P. vivax* [PLAVI] as organism term.

TABLE 1 | Clinical and immunological patient characteristics.

| Patient | Age/ Sex | Days since start of symptoms/ therapy | Initial parasitaemia [%] | Complicated malaria | Prophylaxis | Number of malaria episodes | Country visited/ Country of origin | CRP [mg/dl] | Hemoglobin [g/dl] | Thrombocytes [1000/ μ l] | Treatment regimen | Number of EXP1-specific CD4+ T cell responses |
|---------|-------------|--|--------------------------------|------------------------|-----------------|----------------------------------|---|----------------|----------------------|---------------------------------|----------------------|--|
| HH-01 | w 21 | 2/1 | <1 | No | No | >1 | Togo/Germany | 20 | 11.6 | 144 | A/P | 0 |
| HH-02 | m 37 | 6/2 | <1 | No | No | >1 | Benin/Togo | 114 | 12.6 | 102 | PT/DA | 0 |
| HH-03 | m 32 | 28/28 | 4.4 | Yes | No | 1 | Angola, Cameroon, Senegal/Philippines | 9 | 7.6 | 404 | Artesunate + A/P | 2 |
| HH-04 | m 47 | 5/3 | 8 | Yes | No | 1 | Nigeria/Germany | 107 | 15.0 | 32 | Artesunate + A/P | 0 |
| HH-05 | m 60 | 9/3 | 1 | Yes | No | >1 | Congo/Congo | 108 | 9.5 | 7.4 | PT/DA | 0 |
| HH-06 | w 29 | 8/3 | 11 | Yes | No | 1 | occupational: needles/tck/Germany | 67 | 7.7 | 118 | Artesunate | 2 |
| HH-07 | w 27 | 8/6 | <1 | No | No | 1 | Togo/Germany | 14 | 13.9 | 68 | PT/DA | 3 |
| HH-08 | m 36 | 18/13 | <1 | No | No | 1 | Togo/Togo | <5 | 12.8 | 253 | PT/DA | 0 |
| HH-09 | w 27 | 10/3 | <1 | No | No | 1 | Ivory Coast | 40 | 11.1 | 127 | A/P | 3 |
| HH-10 | m 25 | 20/2 | <1 | No | No | 1 | Togo/Ivory Coast | 139 | 13.9 | 81 | PT/DA | 5 |
| HH-11 | m 40 | 10/1 | 7 | Yes | No | 1 | Guinea- Bissau/Guinea- Bissau | 233 | 11.0 | 20 | Artesunate | 0 |
| HH-12 | m 56 | 7/3 | >10 | Yes | Yes (herbal) | 1 | Uganda/Jamaica | 82 | 12.6 | 130 | Artesunate + A/P | 0 |
| HH-13 | m 42 | 7/2 | <1 | No | No | 1 | Nigeria/Nigeria | 225 | 12.2 | 61 | PT/DA | 0 |
| HH-14 | m 53 | 7/1 | <1 | No | Unregularly | 1 | Ivory Coast/Ivory Coast | 73 | 13.7 | 128 | A/P | 1 |
| HH-15 | w 44 | 8/3 | <1 | No | No | >1 | Cameroon/Cameroon | 66 | 10.4 | 106 | A/P | 0 |
| HH-16 | m 52 | 6/3 | <1 | No | No | >1 | Ghana/Togo | 56 | 14.2 | 88 | PT/DA | 4 |
| HH-17 | m 63 | 9/0 | <1 | No | Unregularly | >1 | Ghana/Ghana | 138 | 12.6 | 53 | PT/DA | 0 |
| HH-18 | m 35 | 3/2 | <1 | No | Unregularly | >1 | Nigeria/Nigeria | 27 | 14.4 | 119 | PT/DA | 5 |
| HH-19 | m 19 | 5/2 | <1 | No | No | >1 | Togo/Togo | <5 | 13.0 | 185 | A/P | 0 |
| HH-20 | m 52 | 6/2 | 1 | No | No | >1 | Ghana/Ghana | 239 | 12.8 | 60 | PT/DA | 2 |
| HH-21 | m 31 | 8/2 | <1 | No | No | >1 | Kenya/Germany | 88 | 14.8 | 61 | A/P | 1 |
| HH-22 | w 43 | 5/3 | <1 | No | Unregularly | >1 | Sierra Leone/Sierra Leone | 87 | 11.7 | 82 | PT/DA | 2 |
| HH-23 | m 61 | 7/1 | <1 | No | Unregularly | >1 | Cameroon/Cameroon | 38 | 13.6 | 122 | A/P | 0 |
| HH-24 | w 35 | 6/2 | <1 | No | No | 1 | Nigeria/Germany | 44 | 8.5 | 88 | A/P | 0 |
| HH-25 | m 41 | 5/1 | <1 | No | No | >1 | Guinea/Guinea | 167 | 13.9 | 72 | PT/DA | 3 |
| HH-26 | m 23 | 5/2 | <1 | No | No | 1 | Cambodia/Germany | 66 | 13.2 | 51 | A/P | 1 |
| HH-27 | m 55 | 28/4 | 1 | No | No | >1 | Sudan/Sudan | 46 | 10.9 | 141 | PT/DA | 1 |

(Continued)

TABLE 1 | Continued

| Patient | Age/ Sex | Days since start of symptoms/ therapy | Initial parasitaemia [%] | Complicated malaria | Prophylaxis | Number of malaria episodes | Country visited/ Country of origin | CRP [mg/dl] | Hemoglobin [g/dl] | Thrombocytes [1000/ μ l] | Treatment regimen | Number of EXP1-specific CD4+ T cell responses |
|---------------------------|-------------|--|--------------------------------|------------------------|------------------|----------------------------------|---------------------------------------|----------------|----------------------|---------------------------------|----------------------|--|
| HH-28 | w 38 | 25/1 | <1 | No | No | >1 | Ivory coast/Ivory Coast | 102 | 13.1 | 244 | A/P | 0 |
| HH-29 | m 50 | 8/2 | 4 | No | Yes (Laridam) | >1 | Ghana/Ghana | 223 | 12.1 | 50 | PT/DA | 4 |
| HH-30 | m 50 | 4/1 | 2 | No | No | >1 | Nigeria/Nigeria | 109 | 12.7 | 86 | PT/DA | 0 |
| HH-31 | m 54 | 7/3 | 10 | Yes | No | >1 | Ghana/Ghana | 77 | 11.3 | 125 | PT/DA | 2 |
| HH-32 | m 61 | 18/3 | 2 | Yes | No | >1 | Nigeria/Nigeria | 9 | 10.4 | 168 | Artesunate + A/P | 0 |
| HH-33 | m 42 | 6/2 | <1 | No | No | >1 | Nigeria/Nigeria | 82 | 13.6 | 73 | PT/DA | 0 |
| HH-34 | m 72 | 4/2 | 7 | Yes | No | >1 | Nigeria/Nigeria | 33 | 7.9 | 279 | artesunate + A/P | 0 |
| HH-35 | m 66 | 6/2 | 1 | Yes | No | >1 | Ghana/Ghana | 14 | 11.7 | 116 | Artesunate + A/P | 0 |
| HH-36 | m 62 | 6/1 | <1 | No | No | 1 | Ghana/Ghana | 76 | 15.7 | 71 | A/P | 0 |
| HH-37 | m 33 | 6/3 | <1 | No | No | >1 | Benin/Benin | 118 | 12.7 | 91 | PT/DA | 0 |
| HH-38 | m 58 | 13/1 | <1 | No | No | 1 | Ghana/Ghana | 191 | 12.0 | 73 | PT/DA | 2 |
| HH-39 | m 36 | 3/2 | <1 | No | No | 1 | Ivory coast/Ivory Coast | 87 | 12.7 | 107 | PT/DA | 2 |
| HH-40 | w 43 | 6/2 | <1 | No | No | >1 | Togo/Togo | 128 | 11.0 | 125 | PT/DA | 0 |
| HH-41 | w 49 | 5/4 | <1 | No | No | 1 | Nigeria/Germany | 15 | 12.9 | 66 | A/P | 0 |
| HH-42 | m 43 | 4/2 | <1 | No | Unregularly | >1 | Gabon/Germany | 92 | 16.2 | 83 | A/P | 1 |
| HH-43 | w 26 | | | | | | | | | | | 0 |
| HH-44 | w 20 | 4/2 | 2 | No | No | >1 | Benin/Germany | 88 | 11.9 | 104 | A/P | 1 |
| HH-45 | w 38 | 8/4 | 5 | Yes | No | >1 | Cameroon/Cameroon | 171 | 7.1 | 134 | Artesunate + A/P | 2 |
| Average | 42.82 | 8.59/3.07 | 2.37 | | | | | 89.05 | 12.14 | 111.33 | | 1.09 |
| Number | 45 | 44/44 | 44 | | | | | 44 | 44 | 44 | | 45 |
| Standard deviation | 13.60 | 6.21/4.31 | 3.15 | | | | | 64.63 | 2.11 | 72.00 | | 1.46 |
| Minimum | 19 | 2/0 | <1 | | | | | 5.0 | 7.1 | 7.4 | | 0 |
| Maximum | 72 | 28/28 | 11 | | | | | 239.0 | 16.2 | 404.0 | | 5 |
| Median | 42 | 6.5/2 | <1 | | | | | 82.0 | 12.6 | 96.5 | | 0 |

Patient HH-21 (marked in gray) was infected with *P. vivax* not with *P. falciparum*. All values refer to the first blood sampling. Patient HH-04 suffered from IgA nephritis as comorbidity, patient HH-08 and HH-31 from Schistosomiasis, patient HH-15 from HIV treated with highly active antiretroviral therapy (HAART), patient HH-23 from hepatitis C, patient HH-24 from *Acinetobacter baumannii*, patient HH-27 from hepatitis B and D, patient HH-33 from latent tuberculosis. A/P stands for treatment with atovaquone/proguanil and PT/DA for piperazine tetrathosphate and dihydroartemisinin.

TABLE 2 | Sequences of EXP1 peptides (*P. falciparum*, UniProt ID: Q9U590).

| Peptide | Peptide position | | Amino acid sequence | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|------------------|--------|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| EXP1-P01 | 1–15 | Pool 1 | M | K | I | L | S | V | F | F | L | A | L | F | F | I | I |
| EXP1-P02 | 5–19 | | S | V | F | F | L | A | L | F | F | I | I | F | N | K | E |
| EXP1-P03 | 10–24 | | A | L | F | F | I | I | F | N | K | E | S | L | A | E | K |
| EXP1-P04 | 15–29 | | I | F | N | K | E | S | L | A | E | K | T | N | K | G | T |
| EXP1-P05 | 20–34 | | S | L | A | E | K | T | N | K | G | T | G | S | G | V | S |
| EXP1-P06 | 25–39 | | T | N | K | G | T | G | S | G | V | S | S | K | K | K | N |
| EXP1-P07 | 30–44 | | G | S | G | V | S | S | K | K | K | N | K | K | G | S | G |
| EXP1-P08 | 35–49 | | S | K | K | K | N | K | K | G | S | G | E | P | L | I | D |
| EXP1-P09 | 40–54 | | K | K | G | S | G | E | P | L | I | D | V | H | D | L | I |
| EXP1-P10 | 45–59 | | E | P | L | I | D | V | H | D | L | I | S | D | M | I | K |
| EXP1-P11 | 50–64 | Pool 2 | V | H | D | L | I | S | D | M | I | K | K | E | E | E | L |
| EXP1-P12 | 55–69 | | S | D | M | I | K | K | E | E | E | L | V | E | V | N | K |
| EXP1-P13 | 60–74 | | K | E | E | E | L | V | E | V | N | K | R | K | S | K | Y |
| EXP1-P14 | 65–79 | | V | E | V | N | K | R | K | S | K | Y | K | L | A | T | S |
| EXP1-P15 | 70–85 | | R | K | S | K | Y | K | L | A | T | S | V | L | A | G | L |
| EXP1-P16 | 75–89 | | K | L | A | T | S | V | L | A | G | L | L | G | V | V | S |
| EXP1-P17 | 80–96 | | V | L | A | G | L | L | G | V | V | S | T | V | L | L | G |
| EXP1-P18 | 85–99 | | L | G | V | V | S | T | V | L | L | G | G | V | G | L | V |
| EXP1-P19 | 90–104 | | T | V | L | L | G | G | V | G | L | V | L | Y | N | T | E |
| EXP1-P20 | 95–109 | | G | V | G | L | V | L | Y | N | T | E | K | G | R | H | P |
| EXP1-P21 | 100–114 | Pool 3 | L | Y | N | T | E | K | G | R | H | P | F | K | I | G | S |
| EXP1-P22 | 105–119 | | K | G | R | H | P | F | K | I | G | S | S | D | P | A | D |
| EXP1-P23 | 110–124 | | F | K | I | G | S | S | D | P | A | D | N | A | N | P | D |
| EXP1-P24 | 115–129 | | S | D | P | A | D | N | A | N | P | D | A | D | S | E | S |
| EXP1-P25 | 120–134 | | N | A | N | P | D | A | D | S | E | S | N | G | E | P | N |
| EXP1-P26 | 125–139 | | A | D | S | E | S | N | G | E | P | N | A | D | P | Q | V |
| EXP1-P27 | 130–144 | | N | G | E | P | N | A | D | P | Q | V | T | A | Q | D | V |
| EXP1-P28 | 135–149 | | A | D | P | Q | V | T | A | Q | D | V | T | P | E | Q | P |
| EXP1-P29 | 140–154 | | T | A | Q | D | V | T | P | E | Q | P | Q | G | D | D | N |
| EXP1-P30 | 145–159 | | T | P | E | Q | P | Q | G | D | D | N | N | L | V | S | G |
| EXP1-P31 | 150–162 | | Q | G | D | D | N | N | L | V | S | G | P | E | H | | |

Peptide pool 1 consisted out of EXP1 peptides P1–10, pool 2 out of EXP1 peptides P11–20 and pool 3 out of EXP1 peptides P21–31. The entire EXP1 protein is 162 amino acids long and was divided into 31 overlapping peptides.

HLA Typing

High definition molecular HLA class I and II typing was performed at the Institute of Transfusion Medicine at University Medical Center Hamburg-Eppendorf, by polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO) using the commercial kit SSO LabType as previously described (One Lambda, Canoga Park, CA, USA) (33).

Bulk Stimulation of PBMCs

Cryopreserved PBMCs were thawed and cultivated at $1-5 \times 10^6$ cells/ml for optimal results in 500 μ l of R10 medium (RPMI 1640 medium with 10% FCS (Sigma Aldrich), 1% HEPES buffer and 1% Penicillin-Streptomycin). PBMCs were stimulated with EXP1 peptide pool 1 [EXP1 peptide 1–10 (EXP1-P01–10)], pool 2 (EXP1-P11–20) or pool 3 (EXP1-P21–31) (Table 2) at a final concentration of 10 μ g/ml, together with 1 μ g/ml of anti-CD28 and anti-CD49d antibodies [BD FastImmune™, clone: L293 (CD28) and clone: L25 (CD49d)] for 14 days. Medium with recombinant IL-2 (50 U/ml) was added when necessary. After 14 days, cells were re-stimulated with single EXP1-peptides

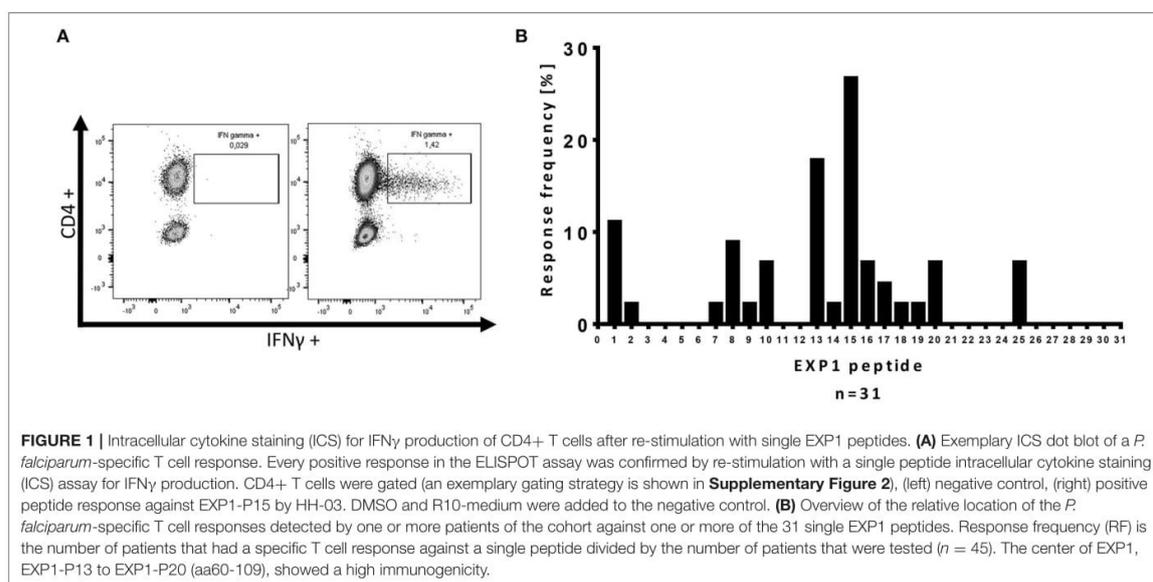
(final concentration 10 μ g/ml) and then assayed for interferon- γ (IFN γ) production by ELISPOT and intracellular cytokine staining (ICS) as previously described (28).

ELISPOT Assay

ELISPOT assays were performed as previously described (26, 28, 34). We used 20,000 cells per well and responses were considered positive if the number of spots was at least three times the number of spots in the negative control. Single peptides were used at a concentration of 10 μ g/ml. Anti-CD3-antibodies served as a positive control, DMSO and R10 as a negative control (35). All positive responses were confirmed by ICS assays following stimulation with the respective peptide.

Intracellular IFN γ Staining and Flow Cytometry

ICS was performed as previously described (26, 28). 5×10^5 PBMCs were stimulated with the corresponding EXP1 peptide at a final concentration of 10 μ g/ml before blocking the secretion with 10 μ g/ml Brefeldin A (Sigma Aldrich) 1 h



after stimulation. Cells were then incubated at 37°C overnight and stained with the Zombie NIR Fixable Viability kit for live cells as well as surface antibodies anti-CD3 (clone: OkT3; AlexaFluor 700), anti-CD4 (clone: SK3; PerCP-Cy5.5) and anti-CD8 (clone: RPA-T8; Brilliant Violet 786) (all antibodies by BioLegend). After fixation and permeabilization (eBioscience™, Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set), cells were stained with anti-IFN γ -antibodies (clone: 4S.B3; PE- Texas red; BioLegend). Cells were then analyzed on a BD LSRFortessa (BD Bioscience). An exemplary gating strategy is shown in **Supplementary Figure 2**. We defined a T cell response as positive when the percentage of CD4+ T cells within the gate for IFN γ was three times higher than the negative control and the population could be clearly separated from the negative control (26, 28, 36). DMSO and R10 were added to the negative control. **Figure 1A** shows an exemplary ICS result of an EXP1-specific CD4+ T cell response.

***In vitro* HLA Binding Assays and *in silico* Prediction**

In vitro binding assays with 14 of the peptides that elicited a response were performed using purified HLA-DR molecules, as previously described (**Table 3**) (37). MHC class II *in silico* binding predictions were defined, using the IEDB analysis resource (38–40), combining predictions from the ANN (41, 42) and SMM (43) algorithms (**Supplementary Table 2A**).

Statistical Analysis

All flow cytometric data were analyzed using FlowJo 10.5.0 software (Treestar, Ashland, OR, USA). Statistical analyses were carried out using the Prism 7.0 software (GraphPad

software, San Diego, CA). Mann Whitney test or the Kruskal–Wallis test with Dunn’s post-test was performed throughout all samples for inter group comparisons. Spearman’s correlation was performed for bivariate correlation analyses. Data are expressed as means with standard deviations (SD) or with standard error of mean (SEM). *P*-values less than or equal to 0.05 were considered significant.

RESULTS

Clinical Features of the Study Cohort

The clinical data of all patients as well as other characteristics are summarized in **Table 1**. The clinical cohort consisted of 45 malaria patients of which 44 patients were infected with *P. falciparum*; one patient was infected with *P. vivax* (marked in gray). 13 patients were female (29%) and 32 were male (71%), and the average age was 42.8 years (range: 19–72 years). Eleven patients (24.4%) were born in Germany, 31 patients (68.9%) originated from the African continent, two patients were from the Philippines and Jamaica. The vast majority of patients who were treated for malaria at University Medical Center Hamburg-Eppendorf had traveled and returned from Western Africa: nine patients had traveled to Nigeria, eight patients to Ghana and five patients to Togo (**Supplementary Figure 3**). Patient HH-21 who was infected by *P. vivax* had traveled to Kenya, where growing evidence of *P. vivax* infection could be shown (44). *P. falciparum* infection was excluded by PCR and the patient had no medical record of a previous *P. falciparum* infection. Only one patient had traveled outside of Africa (to Cambodia). Eleven patients had a course of disease defined as complicated, while 34 courses of the disease were defined as uncomplicated. Further clinical parameters are shown in **Table 1**.

TABLE 3 | *In vitro* binding predictions of 14 *P. falciparum*-specific peptides to 17 frequent DRB1, DRB3, DRB4, and DRB5 types.

| Name | Sequence | DRB1* 01:01 | DRB1* 03:01 | DRB1* 04:01 | DRB1* 04:04 | DRB1* 04:05 | DRB1* 07:01 | DRB1* 08:02 | DRB1* 09:01 | DRB1* 10:01 | DRB1* 11:01 | DRB1* 13:01 | DRB1* 13:02 | DRB1* 15:01 | DRB3* 01:01 | DRB3* 02:02 | DRB3* 01:01 | DRB4* 01:01 | DRB5* 01:01 | Alleles bound | Number of responses |
|-----------------|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|---------------------|
| EXP1 peptide 1 | MKLSVFLALFFII | 21,399 | - | 5,053 | 9,126 | 3,520 | 9,191 | 5,449 | 3,587 | 4,939 | 39,632 | 3,115 | - | 3,359 | - | - | 25,221 | 10,881 | 0 | 5 | |
| EXP1 peptide 2 | SVFLLALFFIENKE | 11,720 | 12,317 | 4,201 | 2,606 | 4,245 | 7,986 | 2,967 | 648 | 3,900 | - | 6,465 | - | 1,549 | 10,639 | - | 17,426 | 6,950 | 1 | 1 | |
| EXP1 peptide 7 | GGVSSKKNKKGSG | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1,962 | - | - | - | - | - | 4,556 | 0 | 1 | |
| EXP1 peptide 8 | SKKKNKGSSEPLD | - | - | - | - | - | - | 29,986 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 4 | |
| EXP1 peptide 10 | EPLIDVHDLSDMIK | 6,016 | 6,770 | 27,548 | 1,108 | 30,955 | - | 2,840 | - | - | - | - | - | 29,167 | 7,963 | - | 162 | - | 1 | 3 | |
| EXP1 peptide 13 | KEELVEVNRKRSKY | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 142 | 1,189 | - | - | - | - | 17,926 | 1,123 | 1 | 8 | |
| EXP1 peptide 14 | VEVNRKRSKYKLATS | 2,345 | - | 58 | - | 83 | 8,296 | - | 77 | 295 | 5,739 | 5,739 | - | 6,103 | 13,943 | 5,836 | - | 89 | 5 | 1 | |
| EXP1 peptide 15 | RKSKYKLATS/LAGLL | 1.1 | 5,823 | 1.2 | 48 | 7.4 | 1.4 | 11,920 | 3.9 | 1.8 | 7.0 | - | 390,43 | 195 | 47 | 2.0 | 230 | 1.0 | 13 | 12 | |
| EXP1 peptide 16 | KLATSLVLAGLWGS | 11 | 10,820 | 390 | 454 | 539 | 133 | 1,152 | 1,364 | 152 | 810 | 32,443 | - | 2,270 | 6,098 | 481 | 567 | 244 | 10 | 3 | |
| EXP1 peptide 17 | VLAGLLGWSTVLGGV | 23 | 1,259 | 47 | 824 | 4.6 | 4.6 | 49 | 12 | 418 | 13,725 | 14,178 | 334,31 | 5.0 | 28,468 | 1,487 | 2,394 | 238 | 9 | 2 | |
| EXP1 peptide 18 | LGVSTVLLGGVGV | 19 | 2,052 | 806 | 806 | 5,017 | 433 | 1,813 | 491 | 1,893 | 6,827 | 8,557 | 32,27 | 300 | 13,497 | - | 194 | 2,471 | 6 | 1 | |
| EXP1 peptide 19 | TVLLGGVGLVNYTE | 8.6 | - | 2,435 | 20,079 | 4,947 | 3,951 | - | 4,452 | 33,954 | - | 7,440 | - | 219 | - | 8,277 | 1,180 | 2 | 1 | | |
| EXP1 peptide 20 | GVGLVNYTEKGRHP | 8,937 | 4,491 | 26 | 9.1 | 2,951 | - | 9.3 | - | 7,971 | 183 | 122 | 17,121 | 24 | - | 4,993 | 81 | 539 | 8 | 3 | |
| EXP1 peptide 25 | NANPDAESENGERN | 19,573 | - | 16,699 | 12,500 | 18,213 | - | 4,012 | - | 33,606 | 23,222 | - | - | 1,097 | - | - | 12,018 | 31,109 | 0 | 3 | |

The binding capacity is displayed as IC50 value deduced from *in vitro* experiments with selected purified HLA-DR molecules and overlapping EXP1 peptides. High affinity binding is defined as IC50 < 1,000 nM and highlighted by bold font. For reasons of comprehensibility, values larger than 40,000 nM are indicated by a dash. The total number of alleles bound as well as the number of CD4+ T cell responses against the responding peptide is shown. EXP1-P15 bound to the highest number of DR-molecules (13 different alleles) *in vitro*.

Initial parasitaemia was on average 2.37% (range: <1–11%), CRP 89 mg/dl (range: 5–239 mg/dl), hemoglobin 12.1 g/dl (range: 7.1–16.2 g/dl), and thrombocytes 111,300 /µl (range: 7,400–404,000 /µl). The average number of days between the start of symptoms and the blood sampling for our study was ~8.6 (range: 2–28 days). The number of days between the start of therapy and the blood sampling for our study was about 3.1 (range: 0–28 days). Patient HH-17 had a blood draw before therapy for malaria was initiated.

Detection of EXP1-Specific T Cell Responses After *in vitro* Cultivation With IL-2

The *P. falciparum*-specific T cell response has so far not been comprehensively assessed for neither the majority of *P. falciparum*-specific antigens in general, nor for EXP1 in particular (9). In order to evaluate the EXP1-specific T cell response on an epitope level, we first looked at the *ex vivo* IFNγ production of PBMCs of acutely infected malaria patients after stimulation with single peptides of an overlapping 13-17-mer peptide set covering the entire *P. falciparum* antigen EXP1. Most samples were drawn 1-4 days after admission to the hospital (average 3.07 days) shortly before, during or after initiation of anti-malaria therapy, only 3 samples were taken at later timepoints.

However, we detected only one T cell response with the *ex vivo* ELISPOT in a total of ten patients (data not shown). The fresh blood sample of patient HH-38 showed an *ex vivo* response against EXP1-P15. After the *in vitro* culture, the same patient responded again to EXP1-P15 and additionally to EXP1-P10. These results are in line with the results of previous studies that showed that the magnitude of the *ex vivo* *P. falciparum*-specific CD4+ and CD8+ T cell response is low (23, 45–47). No EXP1-specific T cell responses were detectable after 14 days of *in vitro* culture of 10 healthy controls that had never traveled to a malaria endemic area (data not shown).

Due to the presumably low *ex vivo* precursor frequencies of *P. falciparum*-specific T cells, we employed a previously used, ultra-sensitive, *in vitro* approach (26–28, 48). In short: our peptide set was divided into three different peptide pools (Table 2) and we started three parallel cell cultures per patient, stimulating them with each pool for 14 days (Pool 1: EXP1-P1-10, Pool 2: EXP1-P11-20, Pool 3: EXP1-P21-31). This was followed by a single peptide ELISPOT for IFNγ-production against re-stimulation with the individual peptides. The 31 overlapping single peptides covered the entire EXP1 protein, and PBMCs from 45 patients were tested. Every positive response in the ELISPOT assay was confirmed by re-stimulation with the according single peptide and subsequent intracellular cytokine staining (ICS) assay for IFNγ production. Figure 1A shows an exemplary ICS result of an EXP1-specific CD4+ T cell response.

With this approach, we were able to distinguish one or more responses directed against 15 of the 31 overlapping EXP1 peptide specificities (48.4%). We detected EXP1-specific CD4+ T cell responses in nearly half of our patients (21/45, 47%) but,

surprisingly, only four patients showed a CD8+ T cell response (4/45, 8.9%) (**Supplementary Figure 4B**). Patients recognized an average of 1.09 CD4+ restricted peptides (range 0–5), with a total number of 49 CD4+ T cell responses in 45 patients. The average frequency of IFN γ +CD4+ T cells was 1.12% (range: 0.2–4.84%) (data not shown). **Figure 1B** gives an overview of the distribution of the different peptide-specific T cell responses. Most responses were directed against epitopes that are located in the center of the EXP1 protein. Eight patients (response frequency (RF): 17.8%; 8/45) showed a CD4+ T cell response against EXP1-P13 (aa60–74), and 12 patients responded to EXP1-P15 (aa70–85) (RF: 26.7%, 12/45). Interestingly, the patient who was infected with *P. vivax* also responded to EXP1-P15. The sequences of *P. falciparum* EXP1-P15 (RKSKYKLATSVLAGLL) and *P. vivax* EXP1 aa68–82 (KKSNYKLATTVLASAL) were then compared and show a high degree of sequence homology (**Supplementary Table 1**).

We also longitudinally analyzed, in selected patients, the EXP1-specific T cell responses in the long-term follow-up. The patient HH-06 showed a large response against EXP1-P15 (frequency: 1.86% IFN γ +CD4+) and EXP1-P25 (frequency: 1.88% IFN γ +CD4+) during acute infection. However, 12 months after the first sampling a specific T cell response could not be detected from a cell culture started directly with fresh blood (data not shown). The patient had stayed in Germany and no further malaria infections had occurred in the intervening 12 months. By contrast, in patient HH-27, who responded to EXP1-P16 (frequency: 3.91% IFN γ +CD4+), we could detect responses against EXP1-P16 (frequency: 9.73% IFN γ +CD4+) and EXP1-P10 (frequency: 0.25% IFN γ +CD4+) in a sample collected 7 years prior to the present assays. During these 7 years, several subsequent malaria infections had occurred as reported by the patient and patient's health provider.

Of the 45 patient samples utilized, seven samples were cultured from fresh samples, of which three patients showed a CD4+ T cell response (42.9%, 3/7). The other 38 samples were stored in liquid nitrogen before analysis, and of these 18 patients showed a T cell response (47.4%, 18/38). Thus, there were no significant differences in the breadth of the detected responses as a function of sample storage conditions (data not shown).

The Breadth of the EXP1-Specific CD4+ T Cell Response Does Not Correlate With the Clinical Course of Acute Malaria

Several clinical parameters, including parasitaemia, CRP, hemoglobin, and thrombocyte count, were examined, but no significant correlation between the number of T cell responses and any of the parameters could be identified (**Figure 2**). Similarly, no correlation was found between age or gender and the CD4+ T cell response (**Supplementary Figure 5**). The patients' origin, the duration of the malaria therapy and the clinical course of the disease (uncomplicated and complicated) did also not correlate with the breadth of the CD4+ T cell response (**Supplementary Figures 6A–C**). When comparing the number of *in vitro* responses between different patient groups,

we could not see significant differences between patients with their first episode of diagnosed malaria infection (52.9%, 9/17) vs. patients who had a documented history of a past malaria infection (44.4%, 12/27) (**Supplementary Figure 6D**).

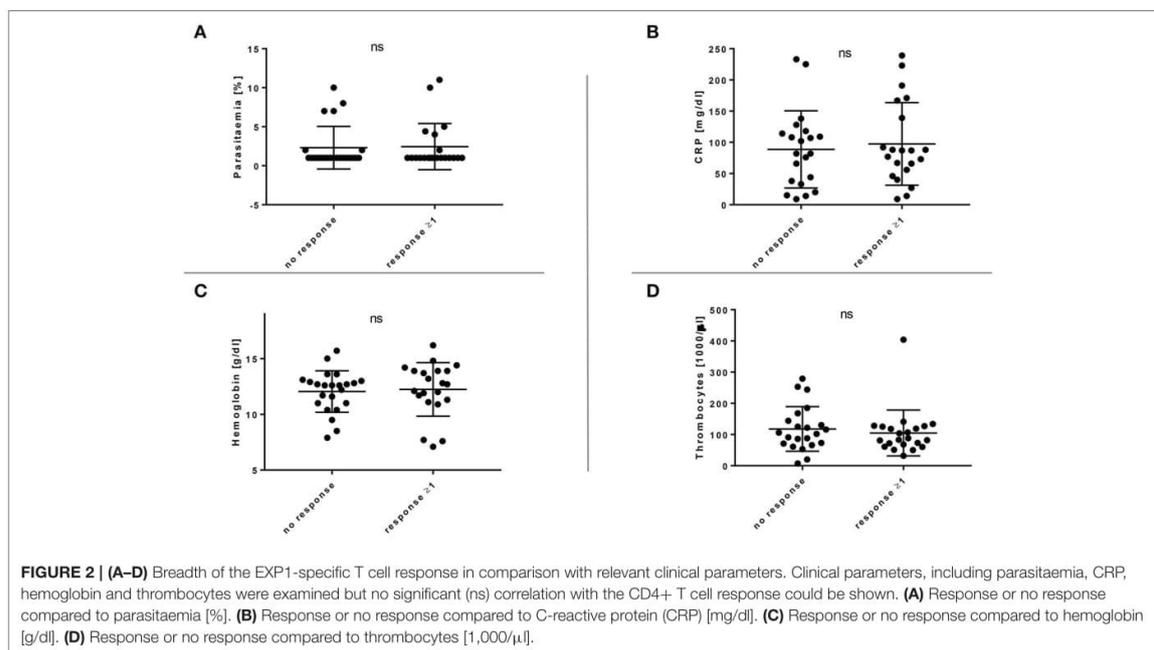
HLA Binding and Restriction Experiments

Table 4 lists the 45 donors examined in the present study along with their HLA-DRB1* typing data and summarizes the individual patient-specific EXP1-peptide response patterns. The finding that certain peptides were recognized by a large proportion of subjects with acute *P. falciparum* infection, despite the fact that they expressed different HLA class II molecules, let us hypothesize that these were comparatively promiscuous MHC class II binding EXP1-specific CD4+ T cell epitopes (i.e., peptides recognized in the context of multiple HLA class II molecules).

To test this hypothesis, we measured the *in vitro* capacity of the most frequently recognized EXP1 peptides to bind to a panel of 17 of the most prevalent human HLA-DR molecules, since the majority of HLA class II restricted CD4+ T cell responses are presented by these molecules (49, 50). Peptides with an IC₅₀ of 1,000 nM or lower, a threshold previously found associated with the vast majority of HLA class II-restricted T cell epitopes, were considered binders to the respective DR molecule (51–53). As shown in **Table 3**, in general the peptides located in the middle of the protein (i.e., EXP1-P14–18; aa65–99) were associated with the most promiscuous binding (range: 5–13 of the 17 DR tested). These include EXP1-P14 which bound to five, EXP1-P15 to 13, EXP1-P16 to 10 and EXP1-P17 to nine different HLA molecules (**Table 3**).

The most frequently recognized peptides were promiscuous in binding to multiple HLA-DR molecules, with each of the peptides binding between zero and 13 different DR molecules. Furthermore, some of these peptides were able to bind to several HLA-DR molecules with extremely high affinities (IC₅₀ < 10 nM) (**Table 3**). EXP1-P15, for example, showed excellent binding to 13 HLA molecules: DRB1*01:01 (1.1 nM), DRB1*04:01 (1.2 nM), DRB1*04:04 (48 nM), DRB1*04:05 (7.4 nM), DRB1*07:01 (1.4 nM), DRB1*09:01 (3.9 nM), DRB1*10:01 (1.8 nM), DRB1*11:01 (7.0 nM), DRB1*15:01 (195 nM), DRB3*01:01 (47 nM), DRB3*02:02 (2.0 nM), DRB4*01:01 (230 nM) and DRB5*01:01 (1.0 nM). This binding pattern is in line with the HLA molecules of the patients that responded to EXP1-P15. Peptides that bound to zero alleles in our DRB *in vitro* assay may be restricted by DQ or DP molecules.

Supplementary Table 2B shows the most likely HLA-restriction considering the *in vitro* binding data as well as the responders' HLA molecules. Nine out of 12 patients who recognized EXP1-P15 expressed at least one of the HLA molecules mentioned above. The most common HLA molecule expressed in patients of our cohort who recognized EXP1-P15 was DRB1*07:01 (six patients). Interestingly, six patients from our cohort also expressed DRB1*07:01 but did not recognize EXP1-P15. EXP1-P13 bound to DRB1*11:01 in the *in vitro* assay (142 nM). This is consistent with the fact that out of eight patients who recognized EXP1-P13, five were carrying the HLA-DRB1*11 molecule.



These results indicate that certain EXP1 peptides, especially those that are located in the center of the protein like EXP1-P15 are potentially promiscuous T cell epitopes.

Fine Mapping of EXP1-P13 and P15

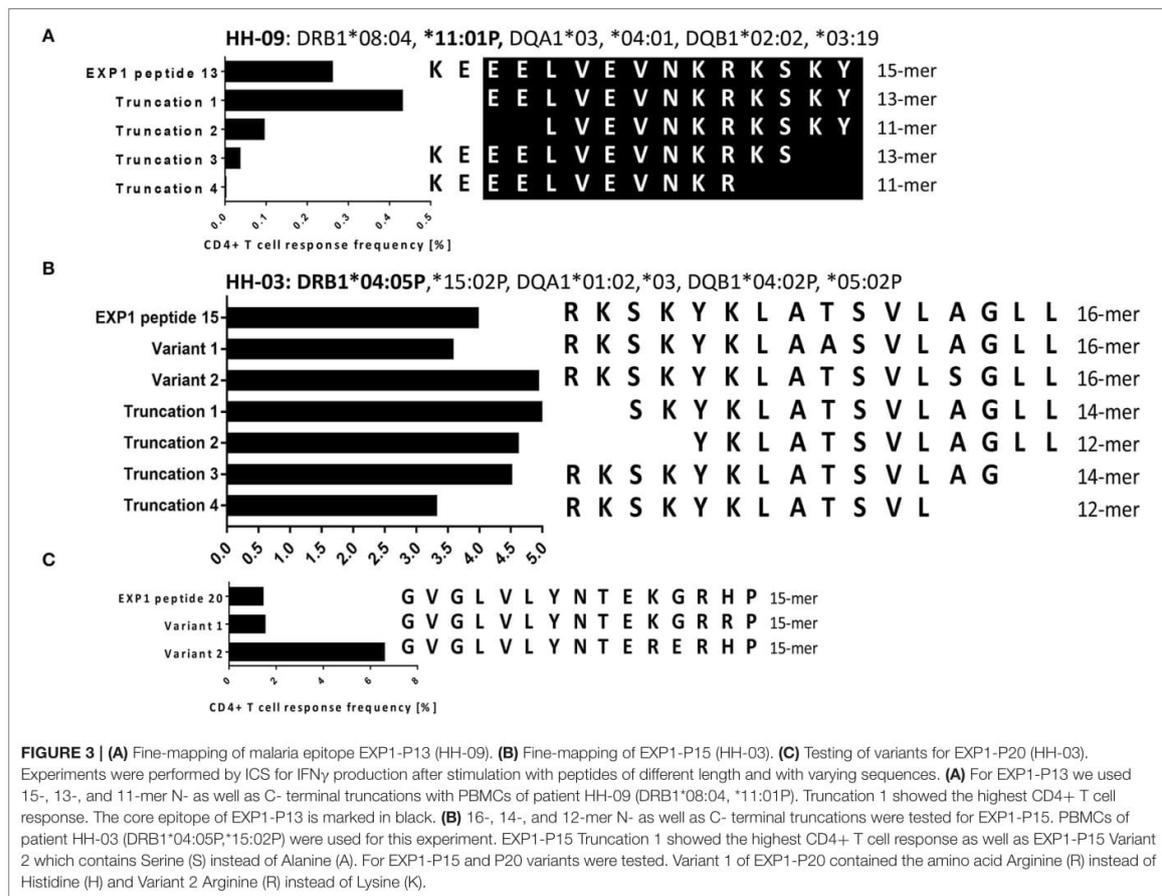
To narrow down the minimal length of the epitopes within EXP1-P13 and P15, we tested the magnitude of the frequency of responding CD4+ T cells by the use of truncations (Figure 3). We first cultivated PBMCs of patients who had shown a strong response against the corresponding peptide with the original peptide (concentration 10 μ g/ml) and then tested the magnitude of the IFN γ responses by ICS. The highest CD4+ T cell frequency for EXP1-P13 was reached by patient HH-09 by EXP1-P13 truncation 1 (13-mer truncation: EELVEVNKRKSKY). For EXP1-P15 the 14-mer EXP1-P15 truncation 1 (SKYKLATSVLAGLL) triggered the biggest response by patient HH-03 and *in vitro* binding data as well as preliminary restriction experiments suggest that this epitope was likely restricted by DRB1*04 (Supplementary Figure 7) in this patient. However, restriction by other molecules like DP and DQ molecules were not tested and cannot be excluded as alternative but less likely restricting molecules.

For both EXP1-P15 and EXP1-P20 we also tested variants found on UniProt (32). EXP1-P15 variant 2 contained serine (S) instead of alanine (A) at position 13 and showed the biggest response. EXP1-P20 variant 1 contained arginine (R) instead of histidine (H) at position 14 and EXP1-P20 variant 2 contained arginine (R) instead of lysine (K) at position 11. EXP1-P20 variant 2 triggered a much bigger response than variant 1. These results show that the change of a single amino acid can lead to

an improvement of binding and therefore recognition and are in line with prior publications (54). No variants for EXP1-P13 could be found in online databases (Supplementary Table 1).

DISCUSSION

Here, we present an immunological study of the *P. falciparum* EXP1-specific T cell response on a single epitope level using PBMCs of a large and well-characterized patient cohort. In concordance with the results of previous studies, frequencies of *ex vivo* EXP1-specific T cell responses were low. However, with our sensitive *in vitro* testing approach we detected T cell responses in 21 of the 45 patients, and discovered responses directed against 15 of 31 peptides (48.4%) spanning the entire EXP1 protein, making this the first study to comprehensively describe responses against a broad range of EXP1-specific epitopes. For most *P. falciparum* antigens previous studies only studied vaccine-primed T cell responses in malaria-naïve volunteers within human vaccine trials (25, 55) which cannot be directly compared with *P. falciparum* T cell responses generated during a natural malaria infection. Other studies used small and partly HLA-A2 pre-selected study populations (54). HLA-A2 is the most common expressed class I HLA in Caucasians, but not as commonly expressed in African individuals. As a result, these previous studies have limited applicability for vaccine design and immunomonitoring in malaria endemic countries. Other studies used *in silico* predicted epitopes or peptide pools instead of comprehensive, overlapping peptide sets (24, 56, 57). However, this approach does not allow the identification of single epitopes



assessing *ex vivo* secretion (e.g., with ELISPOT) of different, additional cytokines (e.g., IL-4, IL-10) that potentially could have been missed using the current approach.

Further subdominant responses might be detectable using peptide sets of peptide variants matching autologous sequences or by applying more sensitive, but far more labor-intensive techniques, like single cell dilution cloning. Patient HH-21 was infected with *P. vivax* and not with *P. falciparum* but the EXP1-specific cultures nevertheless elicited a CD4+ T cell response against EXP1-P15 indicating that immunity against malaria can indeed be cross-species specific. Of note, the sequence of EXP1-P15 (aa70-85) is well-conserved (Supplementary Table 1), potentially making this epitope an interesting candidate for immunomonitoring by MHC-multimer technology or an epitope to be used for a suitable subunit vaccine.

Also, our analysis is limited to samples drawn directly after hospital admission during acute malaria and it is not known how long each patient had been infected. Of note, if we stratify our data according to patients with and without a response, surprisingly the time after malaria treatment did not significantly differ between either group at this early phase of infection

(Supplementary Figure 6B). The single cases for which we were able to analyze the T cell response at later time points would let us hypothesize that the naturally primed EXP1 specific T cell response rapidly wanes over the weeks after successful treatment.

Although EXP1 is likely to be essential for the development and the survival of the parasite, its exact function in the *P. falciparum* malaria life cycle is far from clear and more investigation as well as linkage between important and conserved regions and immunopotent epitopes are necessary (61). Since EXP1 is expressed at the liver stage during a malaria infection we also expected to detect CD8+ T cell responses. However, all CD8+ T cell responses detected in this study were weak and coincided with a parallel CD4+ T cell response directed against the same peptide in the same patient and we did not follow-up on fine-mapping these subdominant T cell responses (Supplementary Figure 4). It has to be considered that the design of our overlapping peptide set, with an average length of 15 amino acids, is biased toward detection of CD4+ T cell responses and could therefore explain low CD8+ T cell responses. Furthermore, prior publications showed that the blood phase of a malaria infection suppresses immune cells of

the liver stage (62, 63). This could also explain the lack of CD8+ T cell responses in our cohort since all patients had an extensive blood phase with strong symptoms and the need to be hospitalized. It has been discussed that CD4+ T cells might play an important role in priming other immune cells (i.e., NK cells) and in evoking a strong antibody response which is necessary for immune control (64, 65). If an efficient induction of immunity against *plasmodial* infection by CD8+ T cells depends on CD4+ T cells, is therefore an important question to address in the development of an effective vaccine.

EXP1 is also called circumsporozoite-related antigen due to a similarity between the amino acid sequence of EXP1 and the circumsporozoite protein (CSP). The CSP is by far the most investigated malaria antigen and it is also part of the RTS,S vaccine trial (66). The amino acid sequence NANPDADSESNGEPN of EXP1 is similar to the NANP-repeat region of the CSP which has so far only shown few T cell responses (67, 68). Interestingly, we detected T cell responses against EXP1-P25 which is located in this NANP-related region of EXP1 and future studies are necessary to evaluate if not only CD4+ T cell and antibody responses against the NANP-repeat region but also CD8+ T cell responses can be found. The cross reactivity of vaccine-induced CSP and EXP1-primed T cell responses should be tested in future studies.

The RTS,S vaccine only showed short lived efficacy and also naturally acquired immunity only lasts a few months (69). Epidemiological evidence described that antibodies to *Plasmodium* antigens are inefficiently generated and rapidly lost without continued parasite exposure (70). We also investigated longitudinal follow-up samples of a subset of patients and could show that the EXP1-specific T cell response primed by natural infection waned over time and was not detectable 12 months after the diagnosis and therapy of acute malaria (data not shown). Unfortunately, it was difficult in the present study to collect samples at later timepoints after the patients were discharged. And future, well-structured and prospective longitudinal studies that describe the dynamics of the priming and the breadth, magnitude and quality of the T cell response directed against different malaria antigens are necessary.

This current study aimed to primarily discover novel *P. falciparum*-specific epitopes with a frequency high enough to be detectable e.g., after enrichment by MHC class II multimer technology. This technology will allow the characterization of the phenotype of T cells which could help to understand the role but also the complications of T cells during malaria infections. In previous studies, EXP1 has shown to generate a strong antibody response in naturally exposed individuals and high antibody titers specific to EXP1 aa73-162 correlated with a high level of IL-6 production to the same peptide (20). This strong recognition by B and T cells suggest that the whole sequence of EXP1 may represent a suitable malaria antigen for a subunit vaccine construct (20).

In summary, a broad range of *P. falciparum* EXP1-specific CD4+ T cell responses can be detected after *in vitro* expansion in nearly half of our patients of different origin and within a diverse HLA molecule background. We did not find any correlation of

the number of T cell responses and relevant clinical parameters in this cohort. These detailed data on *P. falciparum* EXP1-specific T cell epitopes will be helpful for the development of tools like MHC class II multimers or to monitor the immune response on an epitope level during future malaria vaccine trials.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and the study was approved by the local ethics board of the Ärztekammer Hamburg (PV 4238).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JH, TJ, and JSzW: conception. JH and JSzW: first draft. MM performed the HLA-typing. JS: the *in vitro* binding restrictions. All authors: important contributions and proofreading.

FUNDING

This project has been funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB841 (TJ und JSzW) und SFB1328 (JSzW), Deutsches Zentrum für Infektionsforschung DZIF (JH, TJ, and JSzW), and NIH R21AI134127 (AS).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all patients who participated in this study. We also thank Jonas Arand, Tom Diedrich, and Maria Sophia Mackroth for helping with the recruitment of the patients, Silke Kummer and Robin Woost for technical assistance, Sophia Schulte for performing further multi-cytokine ICS assays and Georg Lauer for his critical advice and discussion during the revision process.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.03037/full#supplementary-material>

Supplementary Table 1 | 13 different sequences of *P. falciparum* EXP1 and two sequences of *P. vivax* EXP1. We found 13 different sequences for *P. falciparum* EXP1 in the online database UniProt (31). The sequence of *P. vivax* EXP1 that resembles *P. falciparum* EXP1-P15 is framed. Some sequences are only fragments and therefore shorter than 162 amino acids.

Supplementary Table 2 | *In silico* (A) and most likely (B) binding predictions for EXP1 peptides that elicited a CD4+ T cell response. (A) *In silico* binding predictions for HLA-DRB1 molecules. *In silico* binding predictions were performed as described for 15 EXP1 peptides that at least one patient's CD4+ T cells responded to. The threshold for the binding affinity was defined as 5,0; the most probable binders are displayed in bold. The MHC class II *in silico* binding predictions were made using the IEDB analysis resource consensus tool (38–40)

combining predictions from ANN (41, 42) and SMM (43). **(B)** Most likely HLA-restrictions of the EXP1 peptides that elicited a response as determined by *in silico* and *in vitro* predictions matching the patients' HLA molecules.

Supplementary Figure 1 | Epitope map of EXP1. EXP1 is a 162 amino acid long protein consisting of a signal sequence (aa1–23), an N-terminus (aa23–79), a transmembrane domain (aa79–101), and a C-terminus (aa101–162) (71). Already published CD4+ and CD8+ T cell epitopes as well as HLA-restriction (if known) and newly detected CD4+ T cell epitopes from this study are marked within this epitope map. Marked in light gray: Published CD8+ T cell epitopes: **KILSVFFLA** (23, 25), **ALFFIIFNK** (23), **ATSVLAGL** (21), **VLAGLLGNV** (23), **GLLGNVSTV** (23, 25), **VLLGGVGLVL** (9, 23). Marked in gray: Published CD4+ T cell epitopes: **KSKYKLVSLVLAGLL** (22, 25), **YKLATSVLAGLLGVSTVLLGG** (24, 25), **AGLLG(V/N)VSTVLLGGV** (25), **GLVLYNTEKGRHPFKIGSSD** (9, 24). Marked in dark gray: CD4+ T cell epitopes that elicited a CD4+ T cell response in the current study.

Supplementary Figure 2 | Exemplary gating strategy. Dead cells, CD14+ cells and CD19+ cells were excluded. After gating on single cells and lymphocytes, CD3+ cells were selected. Subsequent IFN γ response was based on either CD8+ or CD4+ T cells.

Supplementary Figure 3 | Countries that were visited by 41 malaria patients are marked by a black dot. Most patients who were treated for malaria at University Hospital of Hamburg had traveled and returned from Western Africa: nine patients had traveled to Nigeria, eight to Ghana, and five patients to Togo.

Supplementary Figure 4 | Exemplary ICS dot blot of a *P. falciparum*-specific CD8+ T cell response of HH-45 against EXP1-P15. **(A)** CD8+ T cells are gated with a negative control (left) and a positive peptide response (right) against EXP1-P15 (aa70–85) by HH-45. DMSO and R10-medium were added to the negative control. **(B)** *P. falciparum*-specific CD4+ T cell response: black, *P. falciparum*-specific CD8+ T cell response: gray. Patient HH-16, HH-18, HH-20 and HH-25 showed a CD8+ T cell response that coincided with a CD4+ T cell response against EXP1-P02, P07, P09, P13, and P15. Interestingly, we did not detect a CD8+ response against a peptide without a CD4+ response against the same peptide.

REFERENCES

- World Health Organization. *World Malaria Report 2018*. (2018). Available at: www.who.int/malaria
- Cockburn IA, Seder RA. Malaria prevention: from immunological concepts to effective vaccines and protective antibodies. *Nat Immunol*. (2018) 19:1199–1211. doi: 10.1038/s41590-018-0228-6
- Cockburn IA, Amino R, Kelemen RK, Kuo SC, Tse S-W, Radtke A, et al. *In vivo* imaging of CD8+ T cell-mediated elimination of malaria liver stages. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2013) 110:9090–5. doi: 10.1073/pnas.1303858110
- Seder RA, Chang L-J, Enama ME, Zephir KL, Sarwar UN, Gordon JJ, et al. Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. *Science*. (2013) 341:1359–65. doi: 10.1126/science.1241800
- Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol*. (2004) 4:169–80. doi: 10.1038/nri1311
- Dobaño C, Moncunill G. Naturally acquired immunity (NAI). In: Kremsner PG and Krishna S, editors. *Encyclopedia of Malaria*. New York, NY: Springer (2018). p. 1–15. doi: 10.1007/978-1-4614-8757-9_131-1
- Nirmalan N, Sims PFG, Hyde JE. Quantitative proteomics of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and its application to studies of development and inhibition. *Mol Microbiol*. (2004) 52:1187–1199. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04049.x
- Crompton PD, Moebius J, Waisberg M, Garver LS, Miller LH, Barillas C, et al. Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. *Annu Rev Immunol*. (2014) 32:157–87. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120220
- Heide J, Vaughan KC, Sette A, Jacobs T, Schulze zur Wiesch J. Comprehensive review of human *Plasmodium falciparum*-specific CD8+ T cell epitopes. *Front Immunol*. (2019) 10:397. doi: 10.3389/fimmu.2019.00397
- Anthony DD, Lehmann PV. T-cell epitope mapping using the ELISPOT approach. *Methods*. (2003) 29:260–9. doi: 10.1016/S1046-2023(02)00348-1
- Spielmann T, Gardiner DL, Beck H-P, Trenholme KR, Kemp DJ. Organization of ETRAMPs and EXP-1 at the parasite-host cell interface of malaria parasites. *Mol Microbiol*. (2006) 59:779–94. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04983.x
- Hill AVS, Elvin J, Willis AC, Aidoo M, Allsopp CEM, Gotch FM, et al. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature*. (1992) 360:434–9. doi: 10.1038/360434a0
- Charoenvit Y, Mellouk S, Sedegah M, Toyoshima T, Leef MF, Delavega P, et al. *Plasmodium yoelii*: 17-kDa hepatic and erythrocytic stage protein is the target of an inhibitory monoclonal antibody. *Exp Parasitol*. (1995) 80:419–29. doi: 10.1006/expr.1995.1054
- Kara UA, Stenzel DJ, Ingram LT, Bushell GR, Lopez JA, Kidson C. Inhibitory monoclonal antibody against a (myristylated) small-molecular-weight antigen from *Plasmodium falciparum* associated with the parasitophorous vacuole membrane. *Infect Immun*. (1988) 56:903–9.
- Doolan DL, Hedstrom RC, Rogers WO, Charoenvit Y, Rogers M, de la Vega P, et al. Identification and characterization of the protective hepatocyte erythrocyte protein 17 kDa gene of *Plasmodium yoelii*, homolog of *Plasmodium falciparum* exported protein 1. *J Biol Chem*. (1996) 271:17861–8. doi: 10.1074/jbc.271.30.17861
- Charoenvit Y, Majam VF, Corradin G, Sacci JB, Wang R, Doolan DL, et al. CD4(+) T-cell- and gamma interferon-dependent protection against murine malaria by immunization with linear synthetic peptides from a *Plasmodium yoelii* 17-kilodalton hepatocyte erythrocyte protein. *Infect Immun*. (1999) 67:5604–14.
- Spielmann T, Montagna GN, Hecht L, Matuschewski K. Molecular make-up of the *Plasmodium parasitophorous vacuolar membrane*. *Int J Med Microbiol*. (2012) 302:179–86. doi: 10.1016/j.ijmm.2012.07.011

18. Coppel RL, Favaloro JM, Crewther PE, Burkot TR, Bianco AE, Stahl HD, et al. A blood stage antigen of *Plasmodium falciparum* shares determinants with the sporozoite coat protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1985) 82:5121–5. doi: 10.1073/pnas.82.15.5121
19. Simmons D, Woollett G, Bergin-Cartwright M, Kay D, Scaife J. A malaria protein exported into a new compartment within the host erythrocyte. *EMBO J*. (1987) 6:485–91. doi: 10.1002/j.1460-2075.1987.tb04779.x
20. Meraldi V, Nebie I, Moret R, Cuzin-Ouattara N, Thiocone A, Doumbo O, et al. Recognition of synthetic polypeptides corresponding to the N- and C-terminal fragments of *Plasmodium falciparum* Exp-1 by T-cells and plasma from human donors from African endemic areas. *Parasite Immunol*. (2002) 24:141–50. doi: 10.1046/j.1365-3024.2002.00447.x
21. Aidoo M, Lalvani A, Gilbert SC, Hu JT, Daubersies P, Hurt N, et al. Cytotoxic T-lymphocyte epitopes for HLA-B53 and other HLA types in the malaria vaccine candidate liver-stage antigen 3. *Infect Immun*. (2000) 68:227–32. doi: 10.1128/IAI.68.1.227-232.2000
22. Doolan DL, Southwood S, Chesnut R, Appella E, Gomez E, Richards A, et al. HLA-DR-promiscuous T cell epitopes from *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic-stage antigens restricted by multiple HLA class II alleles. *J Immunol*. (2000) 165:1123–37. doi: 10.4049/jimmunol.165.2.1123
23. Doolan DL, Hoffman SL, Southwood S, Wentworth PA, Sidney J, Chesnut RW, et al. Degenerate cytotoxic T cell epitopes from *P. falciparum* restricted by multiple HLA-A and HLA-B supertype alleles. *Immunity*. (1997) 7:97–112. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80513-0
24. Quakyi IA, Currier J, Fell A, Taylor DW, Roberts T, Houghten RA, et al. Analysis of human T cell clones specific for conserved peptide sequences within malaria proteins. Paucity of clones responsive to intact parasites. *J Immunol*. (1994) 153:2082–92.
25. Wang R, Richie TL, Baraceres MF, Rahardjo N, Gay T, Banania J, et al. Boosting of DNA vaccine-elicited gamma interferon responses in humans by exposure to malaria parasites boosting of DNA vaccine-elicited gamma interferon responses in humans by exposure to malaria parasites. *Infect Immun*. (2005) 73:2863–72. doi: 10.1128/IAI.73.5.2863-2872.2005
26. Lauer GM, Ouchi K, Chung RT, Nguyen TN, Day CL, Purkis DR, et al. Comprehensive analysis of CD8(+) T-cell responses against hepatitis C virus reveals multiple unpredicted specificities. *J Virol*. (2002) 76:6104–13. doi: 10.1128/JVI.76.12.6104-6113.2002
27. Day CL, Walker BD. Progress in defining CD4 helper cell responses in chronic viral infections. *J Exp Med*. (2003) 198:1773–7. doi: 10.1084/jem.20031947
28. Schulze zur Wiesch J, Lauer GM, Day CL, Kim AY, Ouchi K, Duncan JE, et al. Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J Immunol*. (2005) 175:3603–13. doi: 10.4049/jimmunol.175.6.3603
29. Landahl J, Bockmann JH, Scheurich C, Ackermann C, Matzat V, Heide J, et al. Detection of a broad range of low level MHC class II-restricted Hepatitis Delta Virus (HDV)-specific T cell responses regardless of the clinical status. *J Infect Dis*. (2018) 219:568–77. doi: 10.1093/infdis/jiy549
30. DTG. Leitlinie: Diagnostik und Therapie der Malaria. *Dtsch Gesellschaft für Tropenmedizin und Int Gesundh*. (2016). Available online at: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/042-001l_S1_Malaria_Diagnostik_Therapie_2016-08_verlaengert.pdf (accessed April 25, 2018).
31. UniProt. Available at: <https://www.uniprot.org/> (accessed July 30, 2019).
32. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res*. (2019) 47:D506–15. doi: 10.1093/nar/gky1049
33. da Costa Lima Caniatti MC, Borelli SD, Guilherme ALF, Tsuneto LT. Association between HLA genes and dust mite sensitivity in a Brazilian population. *Hum Immunol*. (2017) 78:88–94. doi: 10.1016/j.humimm.2016.10.014
34. Kim AY, Lauer GM, Ouchi K, Addo MM, Lucas M, Schulze Zur Wiesch J, et al. The magnitude and breadth of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells depend on absolute CD4+ T-cell count in individuals coinfecting with HIV-1. *Blood*. (2005) 105:1170–8. doi: 10.1182/blood-2004-06-2336
35. Posavad CM, Magaret AS, Zhao L, Mueller DE, Wald A, Corey L. Development of an interferon-gamma ELISPOT assay to detect human T cell responses to HSV-2. *Vaccine*. (2011) 29:7058–66. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.07.028
36. Draenert R, Altfeld M, Brander C, Basgoz N, Corcoran C, Wurcel AG, et al. Comparison of overlapping peptide sets for detection of antiviral CD8 and CD4 T cell responses. *J Immunol Methods*. (2003) 275:19–29. doi: 10.1016/S0022-1759(02)00541-0
37. Sidney J, Southwood S, Moore C, Oseroff C, Pinilla C, Grey HM, et al. Measurement of MHC/peptide interactions by gel filtration or monoclonal antibody capture. *Curr Protoc Immunol*. (2013) 100:18.3.1–36. doi: 10.1002/0471142735.im1803s100
38. Kim Y, Ponomarenko J, Zhu Z, Tamang D, Wang P, Greenbaum J, et al. Immune epitope database analysis resource. *Nucleic Acids Res*. (2012) 40:W525–30. doi: 10.1093/nar/gks438
39. Wang P, Sidney J, Dow C, Mothé B, Sette A, Peters B. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Comput Biol*. (2008) 4:e1000048. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000048
40. Wang P, Sidney J, Kim Y, Sette A, Lund O, Nielsen M, et al. Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC Bioinformatics*. (2010) 11:568. doi: 10.1186/1471-2105-11-568
41. Nielsen M, Lundegaard C, Wornning P, Lauemøller SL, Lamberth K, Buus S, et al. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci*. (2003) 12:1007–17. doi: 10.1110/ps.0239403
42. Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O, Nielsen M. NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8–11. *Nucleic Acids Res*. (2008) 36:W509–12. doi: 10.1093/nar/gkn202
43. Peters B, Sette A. Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method. *BMC Bioinformatics*. (2005) 6:132. doi: 10.1186/1471-2105-6-132
44. Twohig KA, Pfeffer DA, Baird JK, Price RN, Zimmerman PA, Hay SI, et al. Growing evidence of *Plasmodium vivax* across malaria-endemic Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. (2019) 13:e0007140. doi: 10.1371/journal.pntd.0007140
45. Chakravarty S, Cockburn I, Kuk S, Medicine MO-N, 2007 U. CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nat Med*. (2007) 13:1035–41. doi: 10.1038/nm1628
46. Epstein JE, Tewari K, Lyke KE, Sim BKL, Billingsley PF, Laurens MB, et al. Live attenuated malaria vaccine designed to protect through hepatic CD8+ T cell immunity. *Science*. (2011) 334:475–80. doi: 10.1126/science.1211548
47. Doolan DL, Southwood S, Freilich DA, Sidney J, Graber NL, Shatney L, et al. Identification of *Plasmodium falciparum* antigens by antigenic analysis of genomic and proteomic data. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2003) 100:9952–7. doi: 10.1073/pnas.1633254100
48. Schulze zur Wiesch J, Ciuffreda D, Lewis-Ximenez L, Kasprovicz V, Nolan BE, Streeck H, et al. Broadly directed virus-specific CD4+ T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence. *J Exp Med*. (2012) 209:61–75. doi: 10.1084/jem.20100388
49. Oseroff C, Sidney J, Kotturi MF, Kolla R, Alam R, Broide DH, et al. Molecular determinants of T cell epitope recognition to the common Timothy grass allergen. *J Immunol*. (2010) 185:943–55. doi: 10.4049/jimmunol.1000405
50. Lindestam Arlehamn CS, Gerasimova A, Mele F, Henderson R, Swann J, Greenbaum JA, et al. Memory T cells in latent *Mycobacterium tuberculosis* infection are directed against three antigenic islands and largely contained in a CXCR3+CCR6+ Th1 subset. *PLoS Pathog*. (2013) 9:e1003130. doi: 10.1371/journal.ppat.1003130
51. Southwood S, Sidney J, Kondo A, del Guercio MF, Appella E, Hoffman S, et al. Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires. *J Immunol*. (1998) 160:3363–73.
52. Sidney J, Steen A, Moore C, Ngo S, Chung J, Peters B, et al. Five HLA-DP molecules frequently expressed in the worldwide human population share a common HLA supertypic binding specificity. *J Immunol*. (2010) 184:2492–503. doi: 10.4049/jimmunol.0903655
53. Sidney J, Steen A, Moore C, Ngo S, Chung J, Peters B, et al. Divergent motifs but overlapping binding repertoires of six HLA-DQ molecules frequently expressed in the worldwide human population. *J Immunol*. (2010) 185:4189–98. doi: 10.4049/jimmunol.1001006

54. Gonzalez JM. HLA-A0201 restricted CD8 T-lymphocyte responses to malaria: identification of new *Plasmodium falciparum* epitopes by IFN- γ ELISPOT. *Parasite Immunol.* (2000) 22:501–14. doi: 10.1046/j.1365-3024.2000.00331.x
55. Sedegah M, Kim Y, Peters B, McGrath S, Ganeshan H, Lejano J, et al. Identification and localization of minimal MHC-restricted CD8+ T cell epitopes within the *Plasmodium falciparum* AMA1 protein. *Malar J.* (2010) 9:241. doi: 10.1186/1475-2875-9-241
56. Sedegah M, Hollingdale MR, Farooq F, Ganeshan H, Belmonte M, Kim Y, et al. Sterile immunity to malaria after DNA prime/adenovirus boost immunization is associated with effector memory CD8+T cells targeting ama1 class I epitopes. *PLoS ONE.* (2014) 9:e106241. doi: 10.1371/journal.pone.0106241
57. Ganeshan H, Kusi KA, Anum D, Hollingdale MR, Peters B, Kim Y, et al. Measurement of *ex vivo* ELISpot interferon-gamma recall responses to *Plasmodium falciparum* AMA1 and CSP in Ghanaian adults with natural exposure to malaria. *Malar J.* (2016) 15:55. doi: 10.1186/s12936-016-1098-8
58. Grifoni A, Moore E, Voic H, Sidney J, Phillips E, Jadi R, et al. Characterization of magnitude and antigen specificity of HLA-DR, DQ, and DRB3/4/5 restricted DENV-specific CD4+ T cell responses. *Front Immunol.* (2019) 10:1568. doi: 10.3389/fimmu.2019.01568
59. Grifoni A, Angelo MA, Lopez B, O'Rourke PH, Sidney J, Cerpas C, et al. Global assessment of dengue virus-specific CD4+ T cell responses in dengue-endemic areas. *Front Immunol.* (2017) 8:1309. doi: 10.3389/fimmu.2017.01309
60. Rogers PR, Huston G, Swain SL. High antigen density and IL-2 are required for generation of CD4 effectors secreting Th1 rather than Th0 cytokines. *J Immunol.* (1998) 161:3844–52.
61. Iriko H, Ishino T, Otsuki H, Ito D, Tachibana M, Torii M, et al. *Plasmodium falciparum* exported protein 1 is localized to dense granules in merozoites. *Parasitol Int.* (2018) 67:637–9. doi: 10.1016/j.parint.2018.06.001
62. Ocaña-Morgner C, Mota MM, Rodriguez A. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J Exp Med.* (2003) 197:143–51. doi: 10.1084/jem.20021072
63. Keitany GJ, Kim KS, Krishnamurthy AT, Hondowicz BD, Hahn WO, Dambrauskas N, et al. Blood stage malaria disrupts humoral immunity to the pre-erythrocytic stage circumsporozoite protein. *Cell Rep.* (2016) 17:3193–205. doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.060
64. Wikenheiser DJ, Brown SL, Lee J, Stumhofer JS. NK1.1 expression defines a population of CD4+ effector T cells displaying Th1 and Tfh cell properties that support early antibody production during *Plasmodium yoelii* infection. *Front Immunol.* (2018) 9:2277. doi: 10.3389/fimmu.2018.02277
65. Illingworth JJ, Alanine DG, Brown R, Marshall JM, Bartlett HE, Silk SE, et al. Functional comparison of blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate antigens. *Front Immunol.* (2019) 10:1254. doi: 10.3389/fimmu.2019.01254
66. Zavala F, Tam J, Hollingdale M, Cochrane A, Quakyi I, Nussenzweig R, et al. Rationale for development of a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *Science.* (1985) 228:1436–40. doi: 10.1126/science.2409595
67. Kastenmüller K, Espinosa DA, Trager L, Stoyanov C, Salazar AM, Pokalwar S, et al. Full-length *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein administered with long-chain poly(I-C) or the toll-like receptor 4 agonist glucopyranosyl lipid adjuvant-stable emulsion elicits potent antibody and CD4+ T cell immunity and protection in mice. *Infect Immun.* (2013) 81:789–800. doi: 10.1128/IAI.01108-12
68. Bongfen SE, Ntsama PM, Offner S, Smith T, Felger I, Tanner M, et al. The N-terminal domain of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein represents a target of protective immunity. *Vaccine.* (2009) 27:328–35. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.09.097
69. Fowkes FJL, Boeuf B. Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. *Parasitology.* (2016) 143:139–53. doi: 10.1017/S0031182015001249
70. Ly A, Hansen DS. Development of B cell memory in malaria. *Front Immunol.* (2019) 10:559. doi: 10.3389/fimmu.2019.00559
71. Sá E, Cunha C, Nyboer B, Heiss K, Sanches-Vaz M, Fontinha D, et al. *Plasmodium berghei* EXP-1 interacts with host apolipoprotein H during *Plasmodium* liver-stage development. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2017) 114:E1138–E1147. doi: 10.1073/pnas.1606419114

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Heide, Wildner, Ackermann, Wittner, Marget, Sette, Sidney, Jacobs and Schulze zur Wiesch. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

2 Darstellung der Publikation

2.1 Einleitung

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation gab es im Jahr 2018 etwa 228 Millionen Erkrankungs- sowie über 400 000 Todesfälle durch Malaria-Infektionen (World Malaria Report der Weltgesundheitsorganisation, 2019). Insbesondere die steigenden Resistenzraten gegen wirksame Medikamente und Insektizide gegen die Anopheles-Mücke, welche als Vektor der Erkrankung dient (Hemingway et al., 2016), stellen ein Hindernis für die weltweite Eradikation der Malaria dar. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einen protektiven Impfstoff gegen Malaria zu entwickeln (Mvumbi et al., 2015).

Die parasitären Erreger der Malaria sind Protozoen, die zu der Gattung *Plasmodium* (*P.*) gehören und durch Anopheles-Mücken übertragen werden (Garcia et al., 2006; Morrisette und Sibley, 2002). Der Mensch kann durch fünf verschiedene Arten von *Plasmodien* infiziert werden: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* und *P. knowlesi* (Meibalan und Marti, 2017). Diese Dissertation fokussiert sich auf den Erreger *P. falciparum*, welcher die häufigste Form der Malaria, die sogenannte Malaria tropica, verursacht, die für den Großteil der durch Malaria hervorgerufenen Todesfälle verantwortlich ist (Meibalan und Marti, 2017). Wie alle *Plasmodien* durchläuft auch *P. falciparum* einen komplexen Lebenszyklus mit einem obligaten Wirtswechsel zwischen der Anopheles-Mücke, in der eine geschlechtliche Vermehrung stattfindet und dem Menschen, in dem sich die Parasiten ungeschlechtlich fortpflanzen. Im Menschen findet nach Übertragung der Parasiten durch den Stich der Anopheles-Mücke zunächst die sogenannte Leberphase statt, in welcher die Malariaerreger menschliche Hepatozyten befallen und in der noch keine klinischen Symptome auftreten (Artavanis-Tsakonas et al., 2003). Die Leberphase wird gefolgt von der sogenannten Blutphase, in der sich die *Plasmodien* innerhalb von Erythrozyten vermehren (Meibalan und Marti, 2017). In der Blutphase können unspezifische Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen und Übelkeit auftreten. Die sogenannte Parasitämie gibt hierbei prozentual an, wie viele Erythrozyten infiziert sind (Meibalan und Marti, 2017). Während der verschiedenen Phasen des Lebenszyklus der Parasiten ändert sich deren Proteinexpression (Crompton et al., 2014). Dies hat zur Folge, dass das Immunsystem fortlaufend neue Antigene erkennen muss, was die Ausbildung einer effektiven Immunantwort erschwert (Dobaño und Moncunill, 2018). Detaillierte Kenntnisse des

Lebenszyklus der Parasiten sind daher wichtig, um die Entstehung von Immunität gegen die *Plasmodien* zu verstehen.

Ein funktionell wichtiges Antigen der *Plasmodien* ist das Circumsporozoite Protein (CSP), ein Protein, welches ausschließlich in der Leberphase exprimiert wird und für zentrale Funktionen der Sporozoiten wie die Bindung an Hepatozyten notwendig ist (Ménard et al., 1997; Thathy et al., 2002; Triller et al., 2017). Es wird vermutet, dass eine effiziente Immunantwort gegen dieses entscheidende Protein das Eindringen der Erreger in die Hepatozyten und somit die Entstehung einer symptomatischen Infektion verhindern könnte (Hafalla et al., 2002). Dieser Ansatz wurde bei der Entwicklung der RTS,S Impfung verfolgt. Das Akronym RTS,S steht für Repeat-Region des CSP, T-Zell-Epitope und Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg). Es handelt sich bei der RTS,S-Impfung um ein rekombinantes Protein, welches aus einem verkürzten CSP mit einer Reihe von T-Zell- und Antikörper-Epitopen besteht und mit dem Hepatitis-B-Oberflächenantigen fusioniert wurde, um T-Zell- und Antikörper-Antworten gegen *P. falciparum* zu generieren (Cohen et al., 2010; Agnandji et al., 2012). Es ist der bisher einzige Impfstoff, der sich in Feldstudien in Hochendemiegebieten als wirksam erwies (Schuerman, 2019). Der Schutz der Impfung war jedoch nur moderat und die Anzahl an Malariaepisoden bei durch die Erkrankung besonders gefährdeten Kleinkindern wurde durch die Vakzinierung lediglich um 39% gesenkt (Schuerman, 2019). Zudem nahm die Schutzwirkung des RTS,S Impfstoffes mit der Zeit ab und war im Durchschnitt nach vier Jahren nicht mehr nachweisbar (RTS,S Clinical Trials Partnership, 2015; Schuerman, 2019). Die Gründe für diese begrenzte Wirksamkeit der Impfung sind weiterhin unklar (Cockburn und Seder, 2018).

Bereits vor über 50 Jahren konnte gezeigt werden, dass eine effektive Aktivierung des Immunsystems gegen Malaria prinzipiell möglich ist. Nussenzweig et al. stellten 1967 fest, dass Mäuse mit durch Röntgenstrahlung inaktivierten Sporozoiten immunisiert werden konnten (Nussenzweig et al., 1967). Clyde et al. haben 1973 inaktivierte Sporozoiten durch Anopheles-Mücken auf Proband*innen übertragen, welche daraufhin teilweise gegen eine natürliche Malaria-Infektion geschützt waren (Clyde et al., 1973). Diese Methode ist jedoch nicht praktikabel, um eine große Anzahl an Menschen zu impfen, zumal kein langanhaltender Schutz gegen Malaria erreicht wurde (Cockburn und Seder, 2018; Langhorne et al., 2008). Die Entwicklung eines effizienten und sicheren Impfstoffes, der zudem einen langanhaltenden Schutz vermittelt, erwies sich trotz jahrzehntelanger

Forschung als nicht erfolgreich (Epstein et al., 2011). Das große Genom der *Plasmodien*, das über 5300 Gene kodiert, sowie der ausgeprägte Polymorphismus der einzelnen Gene und der komplexe Lebenszyklus der Parasiten stellen Hindernisse bei der Entstehung der Immunität und der Entwicklung einer wirksamen Impfung gegen Malaria dar (Crompton et al., 2014; Gardner et al., 2002). Für die Impfstoffentwicklung ist es daher wichtig, die Interaktion zwischen Mensch und Parasit genauer zu untersuchen und die Immunität gegen Malaria auf zellulärer Ebene zu verstehen (Cockburn und Seder, 2018).

Untersuchungen der letzten Jahrzehnte konnten beweisen, dass T-Zellen in der effektiven Kontrolle der Malaria eine ausschlaggebende Rolle zukommt: In Versuchen mit Mäusen und Rhesusaffen konnte nach Injektion mit bestrahlten Sporozoiten eine effektive Immunantwort nachgewiesen werden. Die Versuchstiere verloren diesen Schutz vor einer Malaria-Infektion jedoch vollständig nach Depletion der CD8+ T-Zellen (Doolan und Hoffman, 2000; Schofield et al., 1987; Weiss und Jiang, 2012; Weiss et al., 1988). Die Übertragung von CSP-spezifischen T-Zellklonen konnte das Auftreten einer Malaria-Infektion bei Malaria-naiven Mäusen verhindern und Mäuse mit einer hohen Anzahl an *Plasmodium*-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen waren besser gegen eine Infektion mit dem Malariaerreger geschützt, als Mäuse mit einer niedrigen spezifischen T-Zell-Frequenz (Franke et al., 1997; Hafalla et al., 2013; Pichugin et al., 2018; Rodrigues et al., 1991; Romero et al., 1989; Schneider et al., 1997; Weiss et al., 1992). Auch beim Menschen führte eine Impfung sowohl mit intakten als auch mit bestrahlten Sporozoiten zu einem Anstieg von pluripotenten T-Gedächtniszellen und verlieh, wenn auch nur kurzzeitig, eine Immunität (Roestenberg et al., 2009). Des Weiteren hat sich gezeigt, dass die durch Antikörper erlangte Immunität unzureichend ist, was unter anderem auf die hohe Variabilität der Oberflächenantigene im Blutstadium zurückzuführen ist (Chan et al., 2012; Cockburn und Seder, 2018). T-Zell-Epitope sind jedoch meist besser konserviert als Antikörper-Epitope und ermöglichen somit eine stabilere und stärkere Immunantwort (Imai et al., 2010). Die wichtige Rolle der T-Zellen in der Immunität gegen Malaria wird außerdem durch die Erkenntnis bestärkt, dass der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC-) Klasse-I Typ HLA-B*53 und MHC-Klasse-II Typ HLA-DRB*13:02 und DQB1*05:01 mit einer Resistenz gegen komplizierte Malaria-Verläufe assoziiert sind (Hill et al., 1991). Diese humanen Leukozyten Antigen- (HLA-) Moleküle sind vorwiegend in Westafrika verbreitet und gelten als eines der vielen Indizien für den Selektionsdruck, den Malaria auf die Evolution des Menschen in Westafrika ausgeübt hat (Hill et al., 1991).

Trotz der großen Bedeutung, die spezifische T-Zellen in der Immunantwort gegen Malaria spielen, gibt es kaum Studien, die den Phänotyp und die Funktion von T-Zellen während der akuten Malaria-Infektion untersucht haben (Heide et al., 2019). Auch die Immunepitope von spezifischen T-Zellen, die gegen *P. falciparum* gerichtet sind, sind unzureichend erforscht (Heide et al., 2019). Eines der vielen *P. falciparum*-Antigene, welches bislang kaum auf seine spezifische T-Zell-Antwort untersucht wurde, ist das Exported Protein 1 (EXP1). In bisherigen Studien wurden nur sechs CD8+ T-Zell-Epitope und vier CD4+ T-Zell-Epitope innerhalb dieses Antigens nachgewiesen (Aidoo et al., 2000; Doolan et al., 1997, 2000; Heide et al., 2019; Quakyi et al., 1994; Wang et al., 2005).

EXP1 ist 162 Aminosäuren (amino acids, aa) lang, wird sowohl in der Leber- als auch in der Blutphase exprimiert und übernimmt essentielle Funktionen für den Parasiten (Sá E Cunha et al., 2017; Spielmann et al., 2006): Innerhalb der Wirtszelle reifen die *Plasmodien* in einer parasitophoren Vakuole (PV) und sind durch die PV-Membran (PVM) vom Zytosol der Wirtszelle getrennt (Spielmann et al., 2012). Nach Invasion der Wirtszellen wird EXP1 aus dem Parasiten in die PVM transportiert (Iriko et al., 2018; Simmons et al., 1987). Die PVM dient hierbei als Schnittstelle zwischen Parasit und Wirt und ermöglicht dem Parasiten die Nährstoffaufnahme, die Abgabe von Stoffwechselendprodukten und gewährleistet einen Schutz innerhalb der Wirtszelle. EXP1 ist ein bedeutender Bestandteil dieser PVM und hat somit überlebenswichtige Funktionen für den Malariaerreger (Spielmann et al., 2012). Zusätzlich kann EXP1 durch seine Funktion als Glutathion-S-Transferase zum Schutz vor oxidativem Stress beitragen (Lisewski et al., 2014). Diese enzymatische Aktivität wird durch das Malaria-Medikament Artesunat gehemmt (Lisewski et al., 2014).

Abbildung 1 zeigt eine Entropiekarte vom CSP und EXP1, die die Häufigkeit von Mutationen an den einzelnen Aminosäure-Positionen der Antigene darstellt (Heide et al., 2019). Diese Entropiekarten zeigen, dass das CSP viele Mutationen aufweist, EXP1 aber eine konservierte Aminosäuresequenz besitzt. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass für die Berechnung der Entropiekarte des CSP 100 Sequenzen verwendet wurden, wohingegen bei EXP1 nur 12 Sequenzen in Online-Datenbanken zur Verfügung standen (UniProt, 2019).

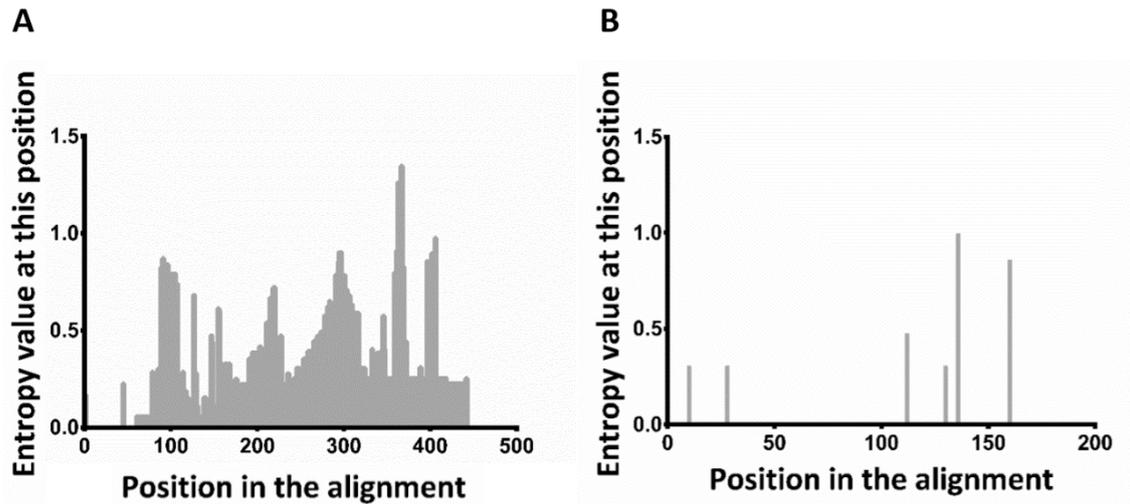


Abbildung 1 (A) Entropiekarte von *P. falciparum* CSP. Der Entropiewert wurde für jede Aminosäure-Position durch Abgleich von 100 verschiedenen *P. falciparum*-Sequenzen berechnet, die auf Uniprot veröffentlicht sind (Uniprot, 2019). Die ersten 78 Aminosäuren des N-Terminus sind gut konserviert. Die NANP-repeat-Region unterscheidet sich in der Anzahl der NANP-Wiederholungen und der C-Terminus stellt sich sehr entropiereich dar. **(B) Entropiekarte von *P. falciparum* EXP1.** Für die Berechnung der EXP1-Entropie wurden 12 verschiedene *P. falciparum*-Sequenzen von EXP1 verglichen. Dies entspricht allen auf UniProt verfügbaren Sequenzen (Heide et al., 2019).

Die vielfältigen und überlebenswichtigen Funktionen, die über mehrere Stämme konservierte und relativ kurze Aminosäuresequenz sowie die Expression sowohl in der Leber- als auch in der Blutphase machen EXP1 zu einem vielversprechenden Antigen für die Analyse von EXP1-spezifischen T-Zellen und damit auch für die Entwicklung eines Malaria-Impfstoffes. Bisherige Impfstudien, die EXP1 verwendet haben, konnten bereits aussichtsreiche Resultate vorweisen: EXP1-spezifische Antikörper hemmten das Wachstum der Parasiten *in vitro* und *in vivo* und Impfstoffe, die Bestandteile von EXP1 beinhalten, konnten im Mausmodell aber auch im Menschen teilweise gegen Malaria schützen (Charoenvit et al., 1999; Doolan et al., 1996; Ewer et al., 2013; Mensah et al., 2017). Es wurde außerdem gezeigt, dass in Malaria-endemischen Ländern lebende Proband*innen eine starke Antikörperantwort gegen EXP1 aufwiesen (Meraldi et al., 2002).

Da angenommen wird, dass *P. falciparum*-spezifische T-Zellen eine bedeutende Rolle in der Immunität gegen Malaria spielen, ist es Ziel dieser Dissertation diese spezifische T-Zell-Antwort auf Peptid-Ebene für EXP1-spezifische Epitope genauer zu analysieren. Ein möglicher Ansatz für die Entwicklung einer Impfung gegen Malaria, welcher z.B. gegen

Hepatitis-B-Viren eingesetzt wird, ist die sogenannte Subunit-Impfung. Dieser Impfstoff besteht aus einzelnen Proteinbestandteilen der Erreger, die in der Lage sind eine Immunantwort auszulösen. Um eine derartige Impfung gegen Malaria zu entwickeln, muss jedoch zunächst untersucht werden, welche Antigen-Bestandteile von spezifischen T-Zellen erkannt werden. Daher wurden in dieser experimentellen Dissertation folgende Fragestellungen behandelt:

- ➔ Sind EXP1-spezifische T-Zellen während einer akuten Malaria-Infektion *ex vivo* im enzyme linked immuno spot (ELISPOT) Assay nachweisbar?
- ➔ Charakterisierung der Breite und Spezifität der EXP1-spezifischen T-Zell-Antwort an einer klinisch ausführlich charakterisierten Patient*innenkohorte mit akuter Malaria.
 - ➔ Gibt es Immunepitope von EXP1, die eine spezifische T-Zell-Antwort in Patient*innen mit verschiedenen HLA-Molekülen auslösen und somit promiskuitiv sind?
 - ➔ Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Magnitude und Breite der EXP1-spezifischen T-Zell-Antwort und relevanten klinischen Parametern sowie der Dauer von Malaria-Infektion und Therapie?

2.2 Material und Methoden



Abbildung 2 Methodik zur Bestimmung der spezifischen T-Zell-Antwort gegen EXP1.

Die PBMC-Proben wurden über 14 Tage mit einem EXP1-Peptid-Pool stimuliert, um eine Expansion der spezifischen T-Zellen zu ermöglichen. Darauf folgend wurde der ELISPOT Assay mit 31 einzelnen EXP1-Peptiden durchgeführt und IFN- γ -Antworten gegen das jeweilige Peptid gemessen. Jede positive ELISPOT-Antwort wurde im ICS bestätigt.

kultiviert. Die drei Peptid-Pools, die zur Stimulation in der T-Zellkultur verwendet wurden, beinhalteten jeweils 10, 10 und 11 der 31 EXP1-Peptide [Tabelle 2 der Publikation (Heide et al., 2020)].

ELISPOT Assay

Nach 14-tägiger T-Zellkultur wurden die PBMCs im ELISPOT Assay mit den 31 einzelnen EXP1-Peptiden re-stimuliert und die Interferon- γ - (IFN- γ -) Sekretion der PBMCs,

Patient*innenkohorte

Für die Durchführung dieser Studie wurden 45 Patient*innen, die an akuter Malaria erkrankt waren, und 10 Freiwillige, die noch nie ein Malaria-endemisches Land bereist hatten, am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf rekrutiert. Blutproben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufes abgenommen. Aus diesen Vollblutproben wurden mononukleäre Zellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) isoliert [Tabelle 1 der Publikation (Heide et al., 2020)].

T-Zellkultur mit EXP1-Peptid-Pools

31 Peptide wurden hergestellt, die die gesamte Aminosäuresequenz des EXP1 abdeckten. Die Peptide waren jeweils 13-17 Aminosäuren lang und überlappten sich um zehn Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz von EXP1 ist auf der Webseite uniprot.org unter der Identifikationsnummer Q9U590 veröffentlicht (UniProt, 2019). **Abbildung 2** zeigt den Ablauf der hier angewandten Methodik zur Detektion von EXP1-spezifischen T-Zellen. PBMCs der Patient*innen wurden vor Durchführung des ELISPOT Assays über 14 Tage mit EXP1-Peptid-Pools und Interleukin-2 (IL-2)

wie bereits beschrieben (Kim et al., 2005; Lauer et al., 2002; Schulze zur Wiesch et al., 2005), untersucht. Im ELISPOT werden ausgeschüttete Zytokine durch spezifische Capture-Antikörper an den Boden der ELISPOT-Platte gebunden und mittels einer chemischen Reaktion sichtbar gemacht. In diesem Fall sezernierten EXP1-spezifische T-Zellen IFN- γ , wenn das hinzugegebene EXP1-Peptid erkannt wurde. Für jede stimulierte EXP1-spezifische T-Zelle erscheint ein Punkt („Spot“) auf dem Boden der ELISPOT-Platte. Eine EXP1-Peptid-Antwort im ELISPOT wurde als positiv gewertet, wenn die Anzahl der „Spots“ mindestens dreimal so groß war wie die jeweilige Negativkontrolle, in welche nur DMSO und Medium hinzugefügt worden war. Für die Positivkontrollen wurden anti-CD3-Antikörper verwendet.

Anfärbung von intrazellulären Zytokinen (intracellular cytokine staining, ICS)

Bei einer positiven IFN- γ -Antwort im ELISPOT wurde diese durch Anfärbung von intrazellulären Zytokinen und darauffolgende Durchflusszytometrie, wie bereits beschrieben (Kim et al., 2005; Lauer et al., 2002), bestätigt. PBMCs aus der T-Zellkultur wurden mit dem EXP1-Peptid, welches eine Antwort im ELISPOT Assay erzeugt hatte, stimuliert. Eine Stunde später wurde die Proteinsekretion der Zelle mittels Brefeldin A blockiert. Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht, wurden die Zellen mit den Oberflächenantikörpern anti-CD3, anti-CD4 und anti-CD8 markiert. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde intrazelluläres IFN- γ angefärbt. Wenn eine T-Zell-Antwort dreimal so groß wie die jeweilige Negativkontrolle war und bei der Analyse eine eindeutig abgrenzbare Population bildete, galt diese als positive EXP1-spezifische CD4+ oder CD8+ T-Zell-Antwort.

Statistische Analyse

Alle Daten der Durchflusszytometrie wurden mit der FlowJo 10.5.0 Software ausgewertet. Die statistische Analyse wurde mit der PRISM 7.0 Software durchgeführt und der Mann-Whitney- oder Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post-Test wurde für alle Analysen zwischen den einzelnen Gruppen innerhalb der Patient*innenkohorte verwendet. Die Spearman-Korrelation wurde bei bivariaten Korrelationsanalysen angewandt. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

2.3 Ergebnisse

EXP1-spezifische T-Zell-Antworten

In dieser Dissertation wurde die EXP1-spezifische CD4⁺ T-Zell-Antwort in einer Patient*innenkohorte (n=45) mit akuter Malaria mittels ELISPOT Assay und ICS nach 14-tägiger T-Zellkultur untersucht. Mit diesem Ansatz konnten eine oder mehrere CD4⁺ T-Zell-Antworten (Durchschnitt: 1.09, Spannweite: 0–5) in 47% (21/45) der Patient*innen detektiert werden.

Abbildung 3 (A) zeigt einen beispielhaften ICS-Dot-Plot einer positiven Peptidantwort von Patient HH-03 gegen EXP1-P15. **Abbildung 3 (B)** stellt hierbei die Verteilung der EXP1-spezifischen Antwortfrequenz dar, also den prozentualen Anteil der Patient*innen, die eine Antwort gegen das jeweilige EXP1-Peptid gezeigt haben. Wie **Abbildung 3 (B)** zeigt, richtete sich ein Großteil der T-Zell-Antworten gegen das Zentrum von EXP1. Die Peptide EXP1-P13 (aa60-74) und P15 (aa70-85) wurden von 18% (n=8) bzw. 27% (n=12) der Patient*innen erkannt. Die durchschnittliche Antwortfrequenz an IFN- γ + CD4⁺ T-Zellen lag bei 1,12% (Bandbreite: 0,2%-4,84%). Vier Patient*innen zeigten zusätzlich zur CD4⁺ T-Zell-Antwort eine CD8⁺ T-Zell-Antwort (4/45, 8.9%) von niedriger Frequenz

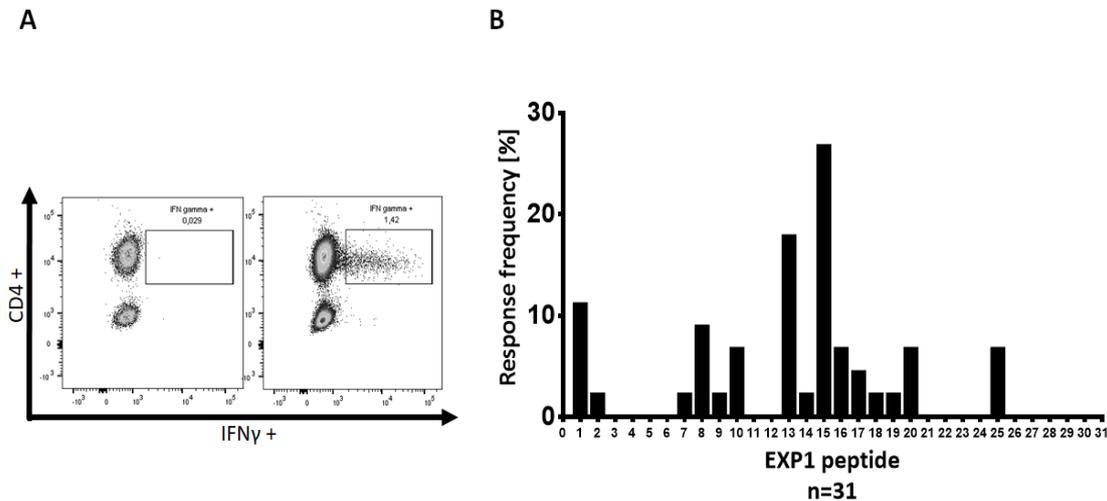


Abbildung 3 Nachweis einer EXP1-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Antwort anhand der IFN- γ -Produktion.

(A) ICS-Dot-Plot einer EXP1-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Antwort von Patient HH-03 gegen Peptid EXP1-P15. Hierfür wurden CD3⁺ T-Zellen gated. Links: Negativkontrolle; Rechts: positive Peptidantwort (IFN- γ -Sekretion). (B) Überblick über die Verteilung der EXP1-spezifischen T-Zell-Antworten. Einige EXP1-Peptide wurden von einem oder mehreren Patient*innen der Kohorte detektiert. Die Antwortfrequenz (response frequency, RF) entspricht der Anzahl der Patient*innen mit einer spezifischen T-Zell-Antwort gegen ein einzelnes Peptid geteilt durch die Anzahl aller getesteten Patient*innen (n = 45). Das Zentrum von EXP1, EXP1-P13 bis EXP1-P20 (aa60-109), zeigt eine hohe Antwortfrequenz und somit eine starke Immunogenität (Heide et al., 2020).

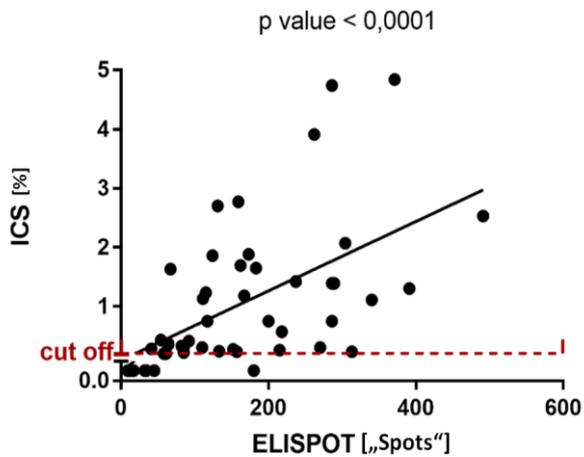


Abbildung 4 Korrelation zwischen ELISPOT [Anzahl der Punkte („Spots“)] und ICS Antwort [in %]. Jede positive Antwort im ELISPOT wurde durch ICS und Durchflusszytometrie überprüft. Die Anzahl der „Spots“ im ELISPOT korrelierte mit der Stärke der Antwort im ICS.

(Durchschnitt: 0,43%, Bandbreite: 0,2%-0,67%). In der Kontrollkohorte (n=10) wurde keine EXP1-spezifische T-Zell-Antwort detektiert.

Abbildung 4 zeigt die signifikante Korrelation zwischen der Anzahl an „Spots“ im ELISPOT Assay und der Stärke der jeweiligen Antwort in Prozent im ICS Assay (p-Wert < 0,0001).

Breite und Spezifität der T-Zell-Antwort in Korrelation mit klinischen Parametern

Die Patient*innenkohorte wurde bezüglich unterschiedlicher Parameter charakterisiert und auf eine Korrelation zwischen diesen Parametern und der spezifischen T-Zell-Antwort untersucht. **Abbildung 5 (A-D)** zeigt den Vergleich zwischen Patient*innen mit und ohne EXP1-spezifischer CD4+ T-Zell-Antwort und der Höhe der Parasitämie, des CRP-Spiegels und der Hämoglobin- und Thrombozytenzahl. Wie aus **Abbildung 5 (A-D)** hervorgeht, bestand kein Zusammenhang zwischen der EXP1-spezifischen T-Zell-Antwort und den analysierten klinischen Parametern. Das Alter der Patient*innen, das Geschlecht, die Herkunft und der Verlauf der Erkrankung (kompliziert oder unkompliziert) scheinen die spezifische CD4+ T-Zell-Antwort ebenfalls nicht signifikant beeinflusst zu haben [Abbildung 5 und 6 des Supplements der Publikation (Heide et al., 2020)].

EXP1-P15-spezifische CD4+ T-Zell-Antwort bei *P. vivax*-Infektion

Patient HH-21 zeigte eine CD4+ T-Zell-Antwort gegen EXP1-P15, obwohl er mit *P. vivax* und nicht mit *P. falciparum* infiziert war. Beim Abgleich der Sequenzen von *P. falciparum* EXP1-P15 (RKSKYKLATSVLAGLL) und *P. vivax* EXP1 aa68-82 (KKSNYKLATTVLASAL) zeigten diese eine hohe Sequenzhomologie (UniProt, 2019) [Tabelle 1 des Supplements der Publikation (Heide et al., 2020)].

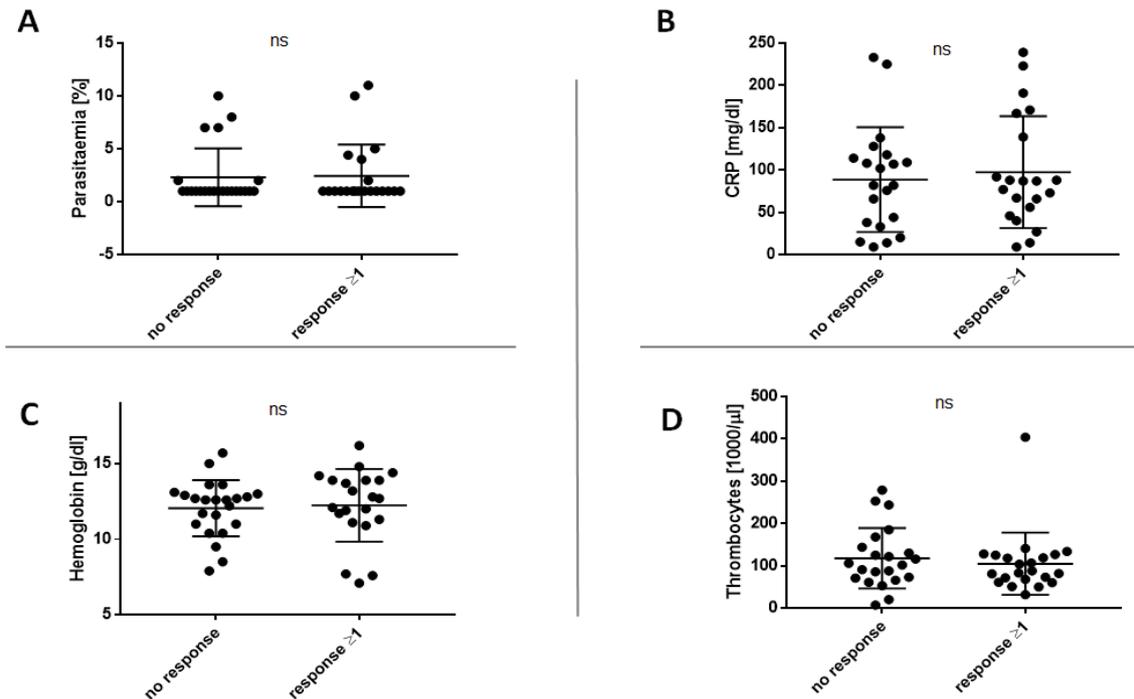


Abbildung 5 Die EXP1-spezifische T-Zell-Antwort im Vergleich zu klinischen Parametern.

(A) Antwort oder keine Antwort im Vergleich zur Parasitämie [%]. (B) Antwort oder keine Antwort im Vergleich zu C-reaktivem Protein (CRP) [mg/dl]. (C) Antwort oder keine Antwort im Vergleich zum Hämoglobin [g/dl]. (D) Antwort oder keine Antwort im Vergleich zur Anzahl der Thrombozyten [1000/ μ l]. ns, nicht signifikant (Heide et al., 2020).

***In vitro* Bindungskapazitäten der CD4+ T-Zell-Epitope**

Mehrere EXP1-Peptide wurden von Proband*innen mit unterschiedlichen HLA-Molekülen erkannt. Um zu überprüfen welche HLA-Moleküle das jeweilige EXP1-Peptid präsentieren, wurde die *in vitro* Bindungskapazität, der am häufigsten erkannten EXP1-Peptide, mit einem Panel von 17 weitverbreiteten HLA-DR-Molekülen durch den Kooperationspartner Dr. John Sidney bestimmt. Die Peptide, die sich im Zentrum von EXP1 befanden (EXP1-P14-18; aa65-99), zeigten hierbei eine hohe Bindungskapazität zu 5-13 der 17 getesteten HLA-DR-Moleküle [Tabelle 3 der Publikation (Heide et al., 2020)]. Im Abgleich mit der *in vitro* ermittelten HLA-Bindungsaffinität der EXP1-Peptide und den durch den Kooperationspartner Dr. Matthias Marget bestimmten HLA-Allelen der Patient*innen [Tabelle 4 der Publikation (Heide et al., 2020)], konnten Rückschlüsse auf die HLA-Restriktion der EXP1-Immuneptope gezogen werden [Tabelle 2 des Supplements der Publikation (Heide et al., 2020)].

Trunkierungsexperimente

Die optimale Länge der Peptide EXP1-P13 und P15 wurde bestimmt, indem die Peptide sowohl am C- als auch am N-Terminus gekürzt wurden. Die unterschiedlichen Peptidlängen wurden mittels ICS getestet. Die Trunkierung, die die größte EXP1-spezifische IFN- γ + CD4+ T-Zell-Antwort auslöste, wurde als optimale Epitop-Länge gewertet. Für EXP1-P13 wurde dies an PBMCs von Patientin HH-09 getestet. Hierbei erreichte die 13 Aminosäuren lange Trunkierung mit der Sequenz **EELVEVNKRKSKY** die größte IFN- γ + CD4+ T-Zell-Antwort. Die größte IFN- γ + CD4+ T-Zell-Antwort für EXP1-P15 erreichte die 14-mer Trunkierung **SKYKLATSVLAGLL** getestet mit kultivierten PBMCs von Patient HH-03 [Abbildung 3 der Publikation (Heide et al., 2020)].

Mapping der longitudinalen CD4+ T-Zell-Antwort mittels ELISPOT und ICS

Um die longitudinale Dynamik der EXP1-spezifischen T-Zell-Antwort zu untersuchen, wurden Blutproben der akut an Malaria erkrankten Patient*innen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Malaria-Infektion gesammelt. Bei Patientin HH-06 konnten keine spezifischen T-Zellen zwölf Monate nach Infektion nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt der akuten Infektion wies die Patientin eine starke CD4+ T-Zell-Antwort gegen zwei EXP1-Peptide auf (Frequenz gegen EXP1-P15: 1,86% IFN- γ + CD4+ T-Zellen und gegen EXP1-P25 1,88% IFN- γ + CD4+ T-Zellen). Bei Patient HH-27 wurde eine spezifische CD4+ T-Zell-Antwort ausschließlich gegen das Peptid EXP1-P16 von 3,91% IFN- γ + CD4+ T-Zellen gemessen. In einer PBMC-Probe, welche von demselben Patienten sieben Jahre zuvor gesammelt worden war, zeigte sich eine Antwort gegen EXP1-P16 von 9,73% und gegen EXP1-P10 von 0,25%. In den sieben Jahren waren nach Angaben des Patienten und laut Krankenakte mehrere Malaria-Infektionen aufgetreten (Heide et al., 2020).

2.4 Diskussion

In dieser Dissertation wurde die Breite und Spezifität der EXP1-spezifischen CD4+ T-Zell-Antwort an einer klinisch ausführlich charakterisierten Patient*innenkohorte mit akuter Malaria untersucht. Bisherige Veröffentlichungen haben gezeigt, dass die Frequenzen von *P. falciparum*-spezifischen T-Zellen besonders während der akuten Malaria-Infektion sehr niedrig waren (Chakravarty et al., 2007; Scholzen und Sauerwein, 2016). Mit der in dieser Studie verwendeten sensitiven Methodik aus spezifischer T-Zellkultur und ELISPOT mit darauffolgendem ICS Assay konnten jedoch 49 verschiedene CD4+ T-Zell-Antworten in 47% (21/45) der Patient*innen detektiert werden. 15 der 31 EXP1 Peptide (48,8%) wurden erkannt, die Peptide EXP-P13 und P15 von 36% der 45 Patient*innen (16/45). *Ex vivo*, also ohne vorherige T-Zellkultur, konnte nur eine CD4+ T-Zell-Antwort gegen EXP1-P15 bei zehn Patient*innen detektiert werden (1/10).

In bisherigen Studien wurde ein Großteil der T-Zell-Epitope in einer Malaria-naiven Studienpopulation entdeckt, welche eine Subunit-Impfung erhalten hatte (Heide et al., 2019; Sedegah et al., 2010; Wang et al., 2005). Hierbei detektierte T-Zell-Antworten sind jedoch nicht mit einer natürlichen Infektion zu vergleichen und nur wenige Studien wurden in einer Kohorte durchgeführt, die an akuter Malaria erkrankt war. Insgesamt ist nur eine geringe Anzahl an *P. falciparum*-Antigenen auf spezifische T-Zell-Antworten untersucht worden und auch hier wurden häufig bereits bekannte oder *in silico* detektierte Immunepitope anstelle eines überlappenden Peptidsatzes verwendet (Ganeshan et al., 2016; Quakyi et al., 1994; Sedegah et al., 2014). Zudem war die Anzahl an Proband*innen häufig sehr gering (Durchschnitt: 10,3 Proband*innen, Spannweite: 1-45), z.T. vorselektiert bezüglich eines bestimmten HLA-Allels [HLA-A*02 (Gonzalez et al., 2000)] und auch klinische Parameter wurden in den meisten Studien nicht erfasst (Heide et al., 2019).

In dieser Dissertation wurde zur genaueren Charakterisierung der Immunepitope EXP1-P13 und P15 deren optimale Länge bestimmt und die HLA-DR-Restriktion eingegrenzt. Hierbei zeigte sich, dass Peptid EXP1-P15 wahrscheinlich unter anderem durch HLA-DRB1*07:01 restringiert wird. Bei der Bewertung der *in vitro* Ergebnisse, die zeigen, welches HLA-DRB-Molekül am wahrscheinlichsten an welches der EXP1-Peptide bindet, muss jedoch Folgendes beachtet werden: HLA-DRB-Moleküle vermitteln ca. 50% der Klasse II Antworten, jedoch ist auch eine Restriktion der Epitope durch HLA-DQ- und

DP-Moleküle möglich (Grifoni et al., 2019). Dies sollte in zukünftigen Studien, z.B. mit einzelnen HLA-Molekül-transfizierten Zelllinien oder durch Blockade mit anti-DR-, DQ- oder DP-Antikörpern genauer untersucht werden.

Um die Sensitivität zur Detektion der EXP1-spezifischen T-Zellen zu erhöhen, wurde eine T-Zellkultur mit Zugabe des proinflammatorischen Zytokin IL-2 durchgeführt. IL-2 verursacht jedoch eine Verschiebung der T-Zellen in Richtung Typ 1 T-Helferzellen (Rogers et al., 1998). Daher kann nach der hier verwendeten Kurzzeitkultur keine verlässliche Aussage mehr über den *ex vivo* Phänotyp oder die Funktionen der detektierten spezifischen T-Zellen getroffen werden. Weitere ergänzende Studien sind daher notwendig, um die *ex vivo* spezifische T-Zell-Antwort und deren Zytokinprofil (z.B. IL-4, IL-10) zu untersuchen, damit genauere Aussagen über die Funktionalität der spezifischen T-Zellen getroffen werden können. Die in dieser Studie detektierten CD4+ T-Zell-Epitope haben sich aufgrund der hohen Antwortfrequenzen für derartige Untersuchungen als besonders geeignet erwiesen.

Diese Dissertation widmete sich u.a. der Fragestellung, ob es EXP1-Immunepeptide gibt, die eine spezifische T-Zell-Antwort in Patient*innen mit verschiedenen HLA-Molekülen auslösen und für die Entwicklung einer Subunit-Impfung geeignet wären. Das Peptid EXP1-P15 führte zu einer CD4+ T-Zell-Antwort in zwölf der 45 Patient*innen (26,6%) und wies zusätzlich eine besonders konservierte Sequenz auf. Diese Eigenschaften machen das EXP1-P15 zu einem interessanten Kandidaten für Immun-Monitoring mit MHC-Multimer-Technologie und zu einem geeigneten Epitop für eine Subunit-Impfung. Außerdem wurde EXP1-P15 von einem mit *P. vivax* infizierten Patienten erkannt. Dies könnte ein Hinweis auf das Bestehen einer Kreuz-Immunität gegen andere Malaria-Spezies sein. Eine Konsensus-Sequenz, bei der an jeder Aminosäure-Position die Aminosäure repräsentiert wird, welche am häufigsten an der betreffenden Stelle vorkommt, wurde bisher nur für das Malaria-Antigen Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) definiert (Nurdiansyah und Kemal, 2020). Die Identifikation weiterer Konsensus-Sequenzen anderer Antigene würde die Detektion immunogener Regionen der Malaria-Antigene erleichtern und sollten daher in zukünftigen Studien festgelegt werden.

In dieser Studie wurde erwartet sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zell-Antworten zu detektieren. Es wurden jedoch nur fünf CD8+ T-Zell-Antworten von sehr niedriger

Frequenz (Durchschnitt: 0,43%) gemessen. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass das Design des verwendeten überlappenden Peptidsatzes mit einer durchschnittlichen Länge von 15 Aminosäuren die Ergebnisse dieser Studie in Richtung einer CD4⁺ T-Zell-Antwort beeinflusst, da die optimale Peptidlänge für MHC-Klasse-I-Moleküle, welche von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden, acht bis zehn Aminosäuren beträgt. MHC-Klasse-II-Moleküle, die mit CD4⁺ T-Zellen interagieren, können hingegen Peptide einer Länge von bis zu 25 Aminosäuren fassen (Matsumura et al., 1992). Um CD8⁺ T-Zellen nachzuweisen, wäre folglich ein Peptidsatz mit einer Länge von acht bis zehn Aminosäuren besser geeignet. Unabhängig von dieser Studie gibt es aber auch allgemeine Erklärungsansätze für niedrige Frequenzen von *P. falciparum*-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. CD8⁺ T-Zellen migrieren in das (Leber-)Gewebe während der akuten Malaria-Infektion (Scholzen und Sauerwein, 2016) und sind somit im peripheren Blut kaum detektierbar. Außerdem wird angenommen, dass immunregulatorische Effekte der Blutphase die Entstehung von Leberphase-spezifischen T-Zellen hemmen (Keitany et al., 2016; Ocaña-Morgner et al., 2003; Yap et al., 2019).

CD4⁺ T-Effektorzellen spielen eine wichtige Rolle beim Priming von weiteren Immunzellen (z.B. natürlichen Killerzellen) und beim Generieren von Antikörperantworten (Illingworth et al., 2019; Wikenheiser et al., 2018). Ob eine Induktion der Immunität gegen Malaria durch CD8⁺ T-Zellen eine effiziente CD4⁺ T-Zell-Antwort benötigt, ist eine wichtige Frage, die für die Entwicklung eines wirksamen Malaria-Impfstoffes beantwortet werden muss.

Ein weiteres Ziel dieser Dissertation war es, die Kinetik der EXP-spezifischen T-Zell-Antwort zu beschreiben. Der RTS,S-Impfstoff zeigte lediglich eine kurzlebige Wirksamkeit und auch die natürlich erworbene Immunität hält nur wenige Monate bei fehlender Reexposition an (Dobaño und Moncunill, 2018; Fowkes et al., 2016; Schuerman, 2019). Die Mechanismen, die diese Kurzlebigkeit der Immunität verursachen, sind noch nicht gänzlich geklärt, T-Zellen scheinen jedoch beim Verlust der Immunität eine Rolle zu spielen (Yap et al., 2019). Die Analyse der longitudinalen T-Zell-Antwort bei Patientin HH-06 und Patient HH-27 deutet darauf hin, dass die spezifische CD4⁺ T-Zell-Antwort dynamisch ist und sich abhängig davon, ob es zu weiteren Malaria-Infektionen kommt, verändert. Ob das Verschwinden oder die Insuffizienz spezifischer T-Zellen den Verlust der erworbenen Immunität verursachen, sollte in weiterführenden Studien geklärt werden.

Aufgrund einer Ähnlichkeit zwischen den Aminosäuresequenzen von EXP1 und dem Leberphase-Protein CSP, wird EXP1 auch als Circumsporozoite-related Antigen, also als mit dem CSP verwandtes Antigen, bezeichnet. Die Aminosäuresequenz **NANPDADSESNGEPN** von EXP1 ähnelt der **NANP-repeat-Region** des CSP. Diese Region des CSP, die aus Wiederholungen der Aminosäuren **NANP** besteht, zeigte bisher nur wenige T-Zell-Antworten (Bongfen et al., 2009; Kastenmüller et al., 2013). Interessanterweise konnten in dieser Dissertation spezifische CD4+ und CD8+ T-Zell-Antworten gegen das Peptid EXP1-P25 detektiert werden, welches sich in dieser **NANP-verwandten Region** von EXP1 befindet. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu bewerten, ob eine Kreuzreaktivität zwischen EXP1 und CSP existiert und somit nicht nur Antikörper-Antworten gegen die **NANP-repeat-Region**, sondern auch spezifische T-Zell-Antworten detektiert werden können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die große Anzahl der *P. falciparum*-Antigene, deren Polymorphismus und fehlende Konsensus-Sequenzen sowie die komplexen Expressionsmuster, welche von dem Lebenszyklus der *Plasmodien* abhängen, eine Herausforderung für die Entwicklung eines Malaria-Impfstoffes darstellen. Es wird jedoch vermutet, dass es funktionell wichtige Epitope gibt, deren Sequenzen über die verschiedenen *Plasmodien*-Stämme hinweg konserviert sind und die für eine Subunit-Impfung geeignet wären (Bull und Abdi, 2016).

In dieser Dissertation wurden die konservierten Immunepitope EXP1-P13 und P15 detektiert, deren hohe Antwortfrequenzen in einer Patient*innenkohorte mit diversen HLA-Allelen mutmaßen lassen, dass diese Peptide für eine Analyse der spezifischen CD4+ T-Zell-Antwort mittels MHC-Multimer-Untersuchungen und longitudinale Betrachtung der T-Zell-Kinetik während einer Malaria-Infektion geeignet sind. Diese Untersuchungen werden maßgeblich zu einem besseren Verständnis der immunologischen Kontrolle von Malaria durch spezifische T-Zellen beitragen. Weiterhin sind die Peptide EXP-P13 und P15 potenzielle Immunepitope für die Verwendung in einer Malaria-Subunit-Impfung, deren Entwicklung effektiv zur Eradikation von Malaria beitragen kann.

3 Literaturverzeichnis

- Aidoo, M., Lalvani, A., Gilbert, S.C., Hu, J.T., Daubersies, P., Hurt, N., Whittle, H.C., Druihle, P. und Hill, A.V.S.S. (2000). Cytotoxic T-lymphocyte epitopes for HLA-B53 and other HLA types in the malaria vaccine candidate liver-stage antigen 3. *Infect. Immun.* *68*, 227–232.
- Artavanis-Tsakonas, K., Tongren, J.E. und Riley, E.M. (2003). The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin. Exp. Immunol.* *133*, 145–152.
- Bongfen S, Ntsama P, Offner S, Smith T, Felger I, Tanner M, Alonso P, Nebie I, Romero J, Silvie O, Torgler R und Corradin G (2009). The N-terminal domain of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein represents a target of protective immunity. *Vaccine* *27*, 328–335.
- Bull, P.C. und Abdi, A.I. (2016). The role of PfEMP1 as targets of naturally acquired immunity to childhood malaria: prospects for a vaccine. *Parasitology* *143*, 171–186.
- Chakravarty S, Cockburn I, Kuk S, Overstreet M, Sacci J, Zavala F (2007). CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nat. Med.* 1035-1041.
- Jo-Anne Chan, Katherine B. Howell, Linda Reiling, Ricardo Ataide, Claire L. Mackintosh, Freya J.I. Fowkes, Michaela Petter, Joanne M. Chesson, Christine Langer, George M. Warimwe, Michael F. Duffy, Stephen J. Rogerson, Peter C. Bull, Alan F. Cowman, Kevin Marsh, and James G. Beeson (2012). Targets of antibodies against *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in malaria immunity. *J. Clin. Invest.* *122*, 3227–3238.
- Charoenvit, Y., Majam, V.F., Corradin, G., Sacci, J.B., Wang, R., Doolan, D.L., Jones, T.R., Abot, E., Patarroyo, M.E., Guzman, F. und Hoffman S. (1999). CD4(+) T-cell- and gamma interferon-dependent protection against murine malaria by immunization with linear synthetic peptides from a *Plasmodium yoelii* 17-kilodalton hepatocyte erythrocyte protein. *Infect. Immun.* *67*, 5604–5614.
- Clyde, D.F., Most, H., McCarthy, V.C. und Vanderberg, J.P. (1973). Immunization of man against sporozite-induced falciparum malaria. *Am. J. Med. Sci.* *266*, 169–177.
- Cockburn, I.A. und Seder, R.A. (2018). Malaria prevention: from immunological concepts to effective vaccines and protective antibodies. *Nat. Immunol.* *19*, 1199–1211.

- Cohen, J., Bennis, S., Vekemans, J. und Leach, A. (2010). Le candidat vaccin antipaludique RTS,S/AS est entré en essais cliniques de phase III. *Ann. Pharm. Françaises* 68, 370–379.
- Crompton, P.D., Moebius, J., Waisberg, M., Garver, L.S., Miller, L.H., Barillas, C., Pierce, S.K., Portugal, S., Waisberg, M., Hart, G., Lindsey S. Garver, Louis H. Miller, Carolina Barillas und Susan K. Pierce (2014). Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. *Annu Rev Immunol.* 32, 157–187.
- Dobaño, C. und Moncunill, G. (2018). Naturally Acquired Immunity (NAI). In *Encyclopedia of Malaria*, P. G. Kremsner, S. Krishna (Hrg.) Springer New York (2018), 1–15.
- Doolan, D.L. und Hoffman, S.L. (2000). The complexity of protective immunity against liver-stage malaria. *J. Immunol.* 165, 1453–1462.
- Doolan, D.L., Hedstrom, R.C., Rogers, W.O., Charoenvit, Y., Rogers, M., Vega, P. de la und Hoffman, S.L. (1996). Identification and Characterization of the Protective Hepatocyte Erythrocyte Protein 17 kDa Gene of *Plasmodium yoelii*, homolog of *Plasmodium falciparum* Exported Protein 1. *J. Biol. Chem.* 271, 17861–17868.
- Doolan D, Hoffman S, Southwood S, Wentworth P, Sidney J, Chesnut R, Keogh E, Appella E, Nutman T, Lal A, Gordon D, Oloo A und Sette A (1997). Degenerate cytotoxic T cell epitopes from *P. falciparum* restricted by multiple HLA-A and HLA-B supertype alleles. *Immunity* 7(1), 97–112.
- Doolan D, Southwood S, Chesnut R, Appella E, Gomez E, Richards A, Higashimoto Y, Maewal A, Sidney J, Gramzinski R, Mason C, Koech D, Hoffman S und Sette A (2000). HLA-DR-promiscuous T cell epitopes from *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic-stage antigens restricted by multiple HLA class II alleles. *J. Immunol.* 165, 1123–1137.
- Epstein J, Tewari K, Lyke K, Sim B, Billingsley P, Laurens M, Gunasekera A, Chakravarty S, James E, Sedegah M, Richman A, Velmurugan S, Reyes S, Li M, Tucker K, Ahumada A, Ruben A, Li T, Stafford R, Eappen A, Tamminga C, Bennett J, Ockenhouse C, Murphy J, Komisar J, Thomas N, Loyevsky M, Birkett A, Plowe C, Loucq C, Edelman R, Richie T, Seder R and Hoffman S (2011). Live Attenuated Malaria Vaccine Designed to Protect Through Hepatic CD8+ T Cell Immunity. *Science* 334, 475–480.
- Ewer K, O'Hara G, Duncan C, Collins K, Sheehy S, Reyes-Sandoval A, Goodman A, Edwards N, Elias S, Halstead F, Longley R, Rowland R, Poulton I, Draper S, Blagborough A, Berrie E, Moyle S, Williams N, Siani L, Folgori A, Colloca S, Sinden R, Lawrie A,

Cortese R, Gilbert S, Nicosia A and Hill A (2013). Protective CD8+ T-cell immunity to human malaria induced by chimpanzee adenovirus-MVA immunisation. *Nat. Commun.* 4, 2836.

Fowkes, F.J.I., Boeuf und Beeson (2016). Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. *Parasitology* 143, 139–153.

Franke, E.D., Corradin, G. und Hoffman, S.L. (1997). Induction of protective CTL responses against the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein by immunization with peptides. *J Immunol* 159, 3424–3433.

Ganeshan, H., Kusi, K.A., Anum, D., Hollingdale, M.R., Peters, B., Kim, Y., Tetteh, J.K.A., Ofori, M.F., Gyan, B.A. und Koram, K.A., Huang J., Belmonte M., Banania J., Dodoo D., Villasante E. und Sedegah M (2016). Measurement of ex vivo ELISpot interferon-gamma recall responses to *Plasmodium falciparum* AMA1 and CSP in Ghanaian adults with natural exposure to malaria. *Malar. J.* 15, 55.

Garcia, J.E., Puentes, A. und Patarroyo, M.E. (2006). Developmental biology of sporozoite-host interactions in *Plasmodium falciparum* malaria: Implications for vaccine design. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 686–707.

Malcolm J. Gardner, Shamira J. Shallom, Jane M. Carlton, Steven L. Salzberg, Vishvanath Nene, Azadeh Shoaibi, Anne Ciecko, Jeffery Lynn, Michael Rizzo, Bruce Weaver, Behnam Jarrahi, Michael Brenner, Babak Parvizi, Luke Tallon, Azita Moazzez, David Granger, Claire Fujii, Cheryl Hansen, James Pederson, Tamara Feldblyum, Jeremy Peterson, Bernard Suh, Sam Angiuoli, Mihaela Pertea, Jonathan Allen, Jeremy Selengut, Owen White, Leda M. Cummings, Hamilton O. Smith, Mark D. Adams, J. Craig Venter, Daniel J. Carucci, Stephen L. Hoffman and Claire M. Fraser (2002). Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 2, 10, 11 and 14. *Nature* 419, 531–534.

Gonzalez, J.M., Peter K, Esposito F, Nebié I, Tiercy J, Bonelo A, Arévalo-Herrera M, Valmori D, Romero P, Herrera S, Corradin G, Alejandro López J (2000). HLA-A0201 restricted CD8 T-lymphocyte responses to malaria: identification of new *Plasmodium falciparum* epitopes by IFN- γ ELISPOT. *Parasite Immunol.* 22, 501–514.

Grifoni A, Moore E, Voic H, Sidney J, Phillips E, Jadi R, Mallal S, De Silva AD, De Silva, AM, Peters B, Weiskopf D and Sette A (2019). Characterization of Magnitude and Antigen Specificity of HLA-DP, DQ, and DRB3/4/5 Restricted DENV-Specific CD4+ T Cell Responses. *Front. Immunol.* 10, 1–10.

Hafalla, J.C.R., Sano, G., Carvalho, L.H., Morrot, A. und Zavala, F. (2002). Short-term antigen presentation and single clonal burst limit the magnitude of the CD8(+) T cell responses to malaria liver stages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11819–11824.

Hafalla, J.C.R., Bauza, K., Friesen, J., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Hill, A.V.S. und Matuschewski, K. (2013). Identification of targets of CD8⁺ T cell responses to malaria liver stages by genome-wide epitope profiling. *PLoS Pathog.* 9, e1003303.

Heide, J., Vaughan, K.C., Sette, A., Jacobs, T. und Schulze zur Wiesch, J. (2019). Comprehensive Review of Human *Plasmodium falciparum*-Specific CD8⁺ T Cell Epitopes. *Front. Immunol.* 10, 397.

Heide, J., Wildner, N.H., Ackermann, C., Wittner, M., Marget, M., Sette, A., Sidney, J., Jacobs, T. und Schulze zur Wiesch, J. (2020). Detection of EXP1-Specific CD4 + T Cell Responses Directed Against a Broad Range of Epitopes Including Two Promiscuous MHC Class II Binders During Acute *Plasmodium falciparum* Malaria. *Front. Immunol.* 10, 1–15.

Hemingway, J., Ranson, H., Magill, A., Kolaczinski, J., Fornadel, C., Gimnig, J., Coetzee, M., Simard, F., Roch, D.K., Hinzoumbe, C.K., Pickett J, Schellenberg D, Gething P, Hoppé M and Hamon N (2016). Averting a malaria disaster: Will insecticide resistance derail malaria control? *Lancet* 387, 1785–1788.

Hill, A.V.S., Allsopp, C.E.M., Kwiatkowski, D., Anstey, N.M., Twumasi, P., Rowe, P.A., Bennett, S., Brewster, D., McMichael, A.J. und Greenwood, B.M. (1991). Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 352, 595–600.

Illingworth, J.J., Alanine, D.G., Brown, R., Marshall, J.M., Bartlett, H.E., Silk, S.E., Labbé, G.M., Quinkert, D., Cho, J.S., Wendler, J.P., Pattinson, David J., Barfod, L., Douglas, A. D., Shea, M. W., Wright, K. E., de Cassan, S. C., Higgins, M. K. and Draper, S. J. (2019). Functional Comparison of Blood-Stage *Plasmodium falciparum* Malaria Vaccine Candidate Antigens. *Front. Immunol.* 10, 1254.

Imai, T., Shen, J., Chou, B., Duan, X., Tu, L., Tetsutani, K., Moriya, C., Ishida, H., Hamano, S., Shimokawa, C., Hisaeda H. und Himeno K. (2010). Involvement of CD8⁺ T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with *Plasmodium yoelii* 17XL strain. *Eur. J. Immunol.* 40, 1053–1061.

Iriko, H., Ishino, T., Otsuki, H., Ito, D., Tachibana, M., Torii, M. und Tsuboi, T. (2018). *Plasmodium falciparum* Exported Protein 1 is localized to dense granules in merozoites.

Parasitol. Int. 67, 637–639.

Kastenmüller, K., Espinosa, D.A., Trager, L., Stoyanov, C., Salazar, A.M., Pokalwar, S., Singh, S., Dutta, S., Ockenhouse, C.F., Zavala, F. und Sedera R. (2013). Full-Length *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein Administered with Long-Chain Poly(I·C) or the Toll-Like Receptor 4 Agonist Glucopyranosyl Lipid Adjuvant-Stable Emulsion Elicits Potent Antibody and CD4⁺ T Cell Immunity and Protection in Mice. *Infect. Immun.* 81, 789–800.

Keitany, G.J., Kim, K.S., Krishnamurty, A.T., Hondowicz, B.D., Hahn, W.O., Dambrauskas, N., Sather, D.N., Vaughan, A.M., Kappe, S.H.I. und Pepper, M. (2016). Blood Stage Malaria Disrupts Humoral Immunity to the Pre-erythrocytic Stage Circumsporozoite Protein. *Cell Rep.* 17, 3193–3205.

Arthur Y. Kim, Georg M. Lauer, Kei Ouchi, Marylyn M. Addo, Michaela Lucas, Julian Schulze zur Wiesch, Joerg Timm, Melinda Boczanowski, Jared E. Duncan, Alysse G. Wurcel, Deborah Casson, Raymond T. Chung, Rika Draenert, Paul Klenerman und Bruce D. Walker (2005). The magnitude and breadth of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells depend on absolute CD4⁺ T-cell count in individuals coinfecting with HIV-1. *Blood* 105, 1170–1178.

Langhorne, J., Ndungu, F.M., Sponaas, A.-M. und Marsh, K. (2008). Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat. Immunol.* 9, 725–732.

Lauer, G.M., Ouchi, K., Chung, R.T., Nguyen, T.N., Day, C.L., Purkis, D.R., Reiser, M., Kim, A.Y., Lucas, M., Klenerman, P. und Walker, B. D. (2002). Comprehensive analysis of CD8(+)-T-cell responses against hepatitis C virus reveals multiple unpredicted specificities. *J. Virol.* 76, 6104–6113.

Andreas Martin Lisewski, Joel P. Quiros, Caroline L. Ng, Anbu Karani Adikesavan, Kazutoyo Miura, Nagireddy Putluri, Richard T. Eastman, Daniel Scandfeld, Sam J. Regenbogen, Lindsey Altenhofen, Manuel Llina, Arun Sreekumar, Carole Long, David A. Fidock und Olivier Lichtarge (2014). Supergenomic Network Compression and the Discovery of EXP1 as a Glutathione Transferase Inhibited by Artesunate. *Cell* 158, 916–928.

Matsumura, M., Fremont, D., Peterson, P. und Wilson, I. (1992). Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* (80-.). 257, 927–934.

- Meibalan, E. und Marti, M. (2017). Biology of malaria transmission. Cold Spring Harb. Richard Sever (Hrg.) Perspect. Boston, Med. Volume 10, Ausgabe 7.
- Ménard, R., Sultan, A.A., Cortes, C., Altszuler, R., van Dijk, M.R., Janse, C.J., Waters, A.P., Nussenzweig, R.S. und Nussenzweig, V. (1997). Circumsporozoite protein is required for development of malaria sporozoites in mosquitoes. *Nature* 385, 336–340.
- Mensah V, Roetyncck S, Kanteh E, Bowyer G, Ndaw A, Oko F, Bliss C, Jagne Y, Cortese R, Nicosia A, Roberts R, D'Alessio F, Leroy O, Faye B, Kampmann B, Cisse B, Bojang K, Gerry S, Viebig N, Lawrie A, Clarke E, Imoukhuede E, Ewer K, Hill A und Afolabi M (2017). Safety and Immunogenicity of Malaria Vectored Vaccines Given with Routine Expanded Program on Immunization Vaccines in Gambian Infants and Neonates: A Randomized Controlled Trial. *Front. Immunol.* 8, 1–15.
- Meraldi, V., Nebie, I., Moret, R., Cuzin-Ouattara, N., Thiocone, A., Doumbo, O., Esposito, F., Traore, A.S., Corradin, G. und Terenzi, S. (2002). Recognition of synthetic polypeptides corresponding to the N- and C-terminal fragments of *Plasmodium falciparum* Exp-1 by T-cells and plasma from human donors from African endemic areas. *Parasite Immunol.* 24, 141–150.
- Agnandji S et al. (2012). The Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Infants. *N. Engl. J. Med.* 367:2284-2295.
- Morrisette, N.S. und Sibley, L.D. (2002). Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 21–38.
- Mvumbi, D.M., Kayembe, J.-M., Situakibanza, H., Bobanga, T.L., Nsibu, C.N., Mvumbi, G.L., Melin, P., De Mol, P. und Hayette, M.-P. (2015). Falciparum malaria molecular drug resistance in the Democratic Republic of Congo: a systematic review. *Malar. J.* 14, 354.
- Nurdiansyah, R. und Kemal, R.A. (2020). Computational design of ancestral and consensus sequence of apical membrane antigen 1 (AMA1) *Acta Biochim. Indones.* 2(2).
- Nussenzweig, R.S., Vanderberg, J., Most, H. und Orton, C. (1967). Protective Immunity produced by the Injection of X-irradiated Sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature* 216, 160–162.
- Ocaña-Morgner, C., Mota, M.M. und Rodriguez, A. (2003). Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197, 143–151.
- RTS,S Clinical Trials Partnership. (2015). Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria

vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: Final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet* 386, 31–45.

Pichugin, A., Zarling, S., Perazzo, L., Duffy, P.E., Ploegh, H.L. und Krzych, U. (2018). Identification of a Novel CD8 T Cell Epitope Derived from *Plasmodium berghei* Protective Liver-Stage Antigen. *Front. Immunol.* 9, 91.

Quakyi, I.A., Currier, J., Fell, A., Taylor, D.W., Roberts, T., Houghten, R.A., England, R.D., Berzofsky, J.A., Miller, L.H. und Good, M.F. (1994). Analysis of human T cell clones specific for conserved peptide sequences within malaria proteins. Paucity of clones responsive to intact parasites. *J. Immunol.* 153, 2082–2092.

Rodrigues, M.M., Cordey, A.S., Arreaza, G., Corradin, G., Romero, P., Maryanski, J.L., Nussenzweig, R.S. und Zavala, F. (1991). CD8+ cytolytic T cell clones derived against the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein protect against malaria. *Int. Immunol.* 3, 579–585.

Roestenberg, M., McCall, M., Hopman, J., Wiersma, J., Luty, A.J.F., van Gemert, G.J., van de Vegte-Bolmer, M., van Schaijk, B., Teelen, K., Arens, T. (2009). Protection against a Malaria Challenge by Sporozoite Inoculation. *N. Engl. J. Med.* 361, 468–477.

Rogers, P.R., Huston, G. und Swain, S.L. (1998). High Antigen Density and IL-2 Are Required for Generation of CD4 Effectors Secreting Th1 Rather Than Th0 Cytokines. *J. Immunol.* 161.

Romero, P., Maryanski, J.L., Corradin, G., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V. und Zavala, F. (1989). Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. *Nature* 341, 323–326.

Sá E Cunha, C., Nyboer, B., Heiss, K., Sanches-Vaz, M., Fontinha, D., Wiedtke, E., Grimm, D., Przyborski, J.M., Mota, M.M., Prudêncio, M. und Mueller, A. K. (2017). *Plasmodium berghei* EXP-1 interacts with host Apolipoprotein H during *Plasmodium* liver-stage development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E1138–E1147.

Schneider, J., Gilbert, S.C., Blanchard, T.J., Hanke, T., Robson, K.J., Hannan, C.M., Becker, M., Sinden, R., Smith, G.L. und Hill, A.V.S. (1998). Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nature Medicine* 4, 397–402.

Schofield, L., Villaquiran, J., Ferreira, A., Schellekens, H., Nussenzweig, R. und

Nussenzweig, V. (1987). γ Interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* 330, 664–666.

Scholzen, A. und Sauerwein, R.W. (2016). Immune activation and induction of memory: Lessons learned from controlled human malaria infection with *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 143, 224–235.

Schuerman, L. (2019). RTS,S malaria vaccine could provide major public health benefits. *Lancet* 394, 735–736.

Schulze zur Wiesch J, Lauer G, Day C, Kim A, Ouchi K, Duncan J, Wurcel A, Timm J, Jones A, Mothe B, Allen T, McGovern B, Lewis-Ximenez L, Sidney J, Sette A, Chung R, Walker B (2005). Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J. Immunol.* 175, 3603–3613.

Sedegah M, Kim Y, Peters B, McGrath S, Ganeshan H, Lejano J, Abot E, Banania G, Belmonte M, Sayo R, Farooq F, Doolan D, Regis D, Tamminga C, Chuang I, Bruder J, King C, Ockenhouse C, Faber B, Remarque E, Hollingdale M, Richie T und Sette A (2010). Identification and localization of minimal MHC-restricted CD8+ T cell epitopes within the *Plasmodium falciparum* AMA1 protein. *Malar. J.* 9, 241.

Sedegah, M., Hollingdale, M.R., Farooq, F., Ganeshan, H., Belmonte, M., Kim, Y., Peters, B., Sette, A., Huang, J., McGrath, S., Abot E., Limbach K., Shi M., Soisson L., Diggs C., Chuang I., Tamminga C., Epstein J., Villasante E. und Richie T. (2014). Sterile immunity to malaria after DNA prime/adenovirus boost immunization is associated with effector memory CD8+T cells targeting ama1 class I epitopes. *PLoS One* 9, e106241.

Simmons, D., Woollett, G., Bergin-Cartwright, M., Kay, D. und Scaife, J. (1987). A malaria protein exported into a new compartment within the host erythrocyte. *EMBO J.* 6(2) 485-491.

Spielmann, T., Gardiner, D.L., Beck, H.-P., Trenholme, K.R. und Kemp, D.J. (2006). Organization of ETRAMPs and EXP-1 at the parasite-host cell interface of malaria parasites. *Mol. Microbiol.* 59, 779–794.

Spielmann, T., Montagna, G.N., Hecht, L. und Matuschewski, K. (2012). Molecular make-up of the *Plasmodium* parasitophorous vacuolar membrane. *Int. J. Med. Microbiol.* 302, 179–186.

- Thathy, V., Fujioka, H., Gantt, S., Nussenzweig, R., Nussenzweig, V. und Ménard, R. (2002). Levels of circumsporozoite protein in the *Plasmodium* oocyst determine sporozoite morphology. *EMBO J.* *21*, 1586–1596.
- Triller, G., Scally, S.W., Costa, G., Pissarev, M., Kreschel, C., Bosch, A., Marois, E., Sack, B.K., Murugan, R., Salman, A.M., Janse, C, Khan S, Kappe S, Adegnika A, Mordmüller B, Levashina E, Julien J und Wardemann H (2017). Natural Parasite Exposure Induces Protective Human Anti-Malarial Antibodies. *Immunity* *47*, 1197-1209.e10.
- Wang, R., Richie, T.L., Baraceros, M.F., Rahardjo, N., Gay, T., Banania, J., Epstein, J.E., Luke, T., Daniel, A., Norman, J. und Hoffman, S. (2005). Boosting of DNA Vaccine-Elicited Gamma Interferon Responses in Humans by Exposure to Malaria Parasites Boosting of DNA Vaccine-Elicited Gamma Interferon Responses in Humans by Exposure to Malaria Parasites. *Infect. Immun.* *73*, 2863–2872.
- Weiss, W.R. und Jiang, C.G. (2012). Protective CD8+ T lymphocytes in Primates Immunized with Malaria Sporozoites. *PLoS One* *7*, e31247.
- Weiss, W.R., Sedegah, M., Beaudoin, R.L., Miller, L.H. und Good, M.F. (1988). CD8+ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 573–576.
- Weiss, W.R., Berzofsky, J.A., Houghten, R.A., Sedegah, M., Hollindale, M. und Hoffman, S.L. (1992). A T cell clone directed at the circumsporozoite protein which protects mice against both *Plasmodium yoelii* and *Plasmodium berghei*. *J. Immunol.* *149*, 2103–2109.
- Weltgesundheitsorganisation (2019). World Malaria Report. [Online im Internet.] URL: <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2019/en/> [Stand: 08.05.2020, 18:15].
- Wikenheiser, D.J., Brown, S.L., Lee, J. und Stumhofer, J.S. (2018). NK1.1 Expression Defines a Population of CD4+ Effector T Cells Displaying Th1 and Tfh Cell Properties That Support Early Antibody Production During *Plasmodium yoelii* Infection. *Front. Immunol.* *9*, 2277.
- Yap, X.Z., Hustin, L.S.P. und Sauerwein, R.W. (2019). TH1-Polarized TFH Cells Delay Naturally-Acquired Immunity to Malaria. *Front. Immunol.* *9*, 1–15.
- Zavala, F., Tam, J.P., Hollingdale, M.R., Cochrane, A.H., Quakyi, I., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V., Barr, P., Altszuler, R., Clavijo, P. (1985). Rationale for development of a

synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *Science* 228(4706) 1436-1440.

UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. [Online im Internet.] URL:

<https://www.uniprot.org/> [Stand: 14.02.2020, 09:12].

4 Summary of publication

Specific T cells are thought to play an important role in the immune response against *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) malaria. This was shown in a variety of studies, both in a mouse model and in humans.

For this study, 45 patients with acute malaria infection were recruited at the Bernhard-Nocht-Klinikum for Tropical Medicine at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf. Mononuclear cells of the peripheral blood were obtained and initially cultivated with an overlapping set of exported protein 1 (EXP1) peptides and interleukin-2 for 14 days. EXP1-specific T cells were then detected with 13-17-mer peptides, covering the entire antigen EXP1, using enzyme linked immuno spot assay (ELISPOT) and intracellular cytokine staining (ICS). The restricting human leukocyte antigen (HLA) type and the optimal epitope length was determined for a more precise characterization of the detected epitopes.

47% (21/45) of the patients showed a specific CD4⁺ T cell response and the peptides EXP1-P13 (aa60-74) and P15 (aa70-85) were recognized by 18% (n = 8) and 27% (n = 12) of the 45 patients. Interestingly, a CD4⁺ T cell response against EXP1-P15 was also detected in a patient who was exclusively infected with *P. vivax*.

This detailed study analyzed the EXP1-specific CD4 + T cell response during acute *P. falciparum* malaria and could serve as basis for future experiments to characterize and phenotype the *P. falciparum*-specific T cell response more precisely using multimer technology or to select immunogenic peptides for subunit vaccinations.

5 Zusammenfassung der Publikationspromotion

Es wird angenommen, dass spezifische T-Zellen eine wichtige Rolle in der Immunantwort gegen *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) Malaria spielen. Dies konnte in einer Vielzahl von Versuchen, sowohl im Mausmodell als auch im Menschen, gezeigt werden. Für diese Studie wurden 45 Patient*innen mit akuter Malaria am Bernhard-Nocht-Klinikum für Tropenmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf rekrutiert, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes gewonnen und zunächst mit einem überlappenden Satz an Exported Protein 1- (EXP1-) Peptiden und Interleukin-2 über 14 Tage kultiviert. EXP1-spezifische T-Zellen wurden dann mit 13-17 Aminosäuren langen Peptiden, welche das gesamte Protein EXP1 abdeckten, anhand der Methode Enzyme Linked Immuno Spot Assay (ELISPOT) und intrazellulärer Zytokin-Färbung (ICS) detektiert. Für eine genauere Charakterisierung der detektierten Epitope, wurde das restringierende humane Leukozyten Antigen- (HLA)-Molekül sowie die optimale Epitop-Länge bestimmt.

47% (21/45) der Patient*innen zeigten eine spezifische CD4⁺ T-Zell-Antwort und die Peptide EXP1-P13 (aa60-74) und P15 (aa70-85) wurden von 18% (n=8) und 27% (n=12) der 45 Patient*innen erkannt. Interessanterweise wurde auch eine CD4⁺ T-Zell-Antwort gegen EXP1-P15 bei einem Patienten detektiert, welcher mit *P. vivax* und nicht mit *P. falciparum* infiziert war.

Diese Dissertation untersuchte die EXP1-spezifische CD4⁺ T-Zell-Antwort während der akuten *P. falciparum* Malaria-Infektion und die Ergebnisse könnten zukünftigen Studien als Grundlage dienen, um die *P. falciparum*-spezifische T-Zell-Antwort mittels Multimer-Technologie genauer zu charakterisieren oder um immunogene Peptide für Subunit-Impfungen auszuwählen.

6 Erklärung des Eigenanteils

Das Thema dieser Dissertation wurde von PD Dr. Thomas Jacobs, PD Dr. Julian Schulze zur Wiesch und mir gemeinsam erarbeitet. Als Grundlage dieser Dissertation führte ich zunächst eine Literaturrecherche zu *P. falciparum*-spezifischen T-Zellen durch, welche im März 2019 als „Comprehensive review of human *Plasmodium falciparum*-specific CD8+ T cell epitopes” in *Frontiers in Immunology* veröffentlicht wurde.

Für die hier vorgestellte Studie rekrutierte ich Patient*innen mit akuter Malaria-Infektion (n=45) am Bernhard-Nocht-Klinikum für Tropenmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, sowie zehn gesunde Proband*innen, erhob die Anamnese und fasste relevante klinische Parameter zusammen. Aus der Vielzahl an möglichen *P. falciparum* Antigenen, wählte ich EXP1 als besonders geeignetes Protein für den ELISPOT Assay aus und unterteilte das Antigen in 31 überlappende Peptide. Daraufhin führte ich jeweils eine 14-tägige T-Zellkultur, den ELISPOT Assay sowie den ICS eigenständig durch. Zudem etablierte ich die Methode zur Bestimmung der HLA-Restriktion der promiskuitiven EXP1-Peptide. Die Zusammenfassung der Daten, die Erstellung aller Abbildungen, sowie die gesamte statistische Analyse erfolgte ebenfalls durch mich unter Rücksprache mit Herrn PD Dr. Julian Schulze zur Wiesch.

Die Veröffentlichung schrieb ich gemeinsam mit PD Dr. Julian Schulze zur Wiesch und bei der Überarbeitung und Korrektur des Artikels unterstützten uns alle Co-Autor*innen. Dr. Matthias Marget führte die HLA-Typisierung der Malaria-Patient*innen und Dr. John Sidney die *in vitro* Untersuchungen der Bindungsaffinität der EXP1-Peptide durch.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Julian Schulze zur Wiesch, der nicht nur meine Doktorarbeit, sondern auch meinen beruflichen Werdegang allzeit unterstützt hat.

Ebenfalls danke ich Herrn PD Dr. Thomas Jacobs vom Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg, für seine stete Hilfsbereitschaft und konstruktiven Anregungen.

Wegen ihrer vielfältigen Unterstützung und der kollegialen Atmosphäre im Labor bin ich der gesamten Arbeitsgruppe Schulze zur Wiesch tief verbunden.

Bei wichtigen Entscheidungen im Studium stand mir meine Mentorin Professor Gunhild von Amsberg mit Rat und Tat zur Seite, herzlichen Dank dafür.

Nicht zuletzt bedanke ich mich beim Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) für die finanzielle Unterstützung, die diese Arbeit erst ermöglicht hat.

8 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: